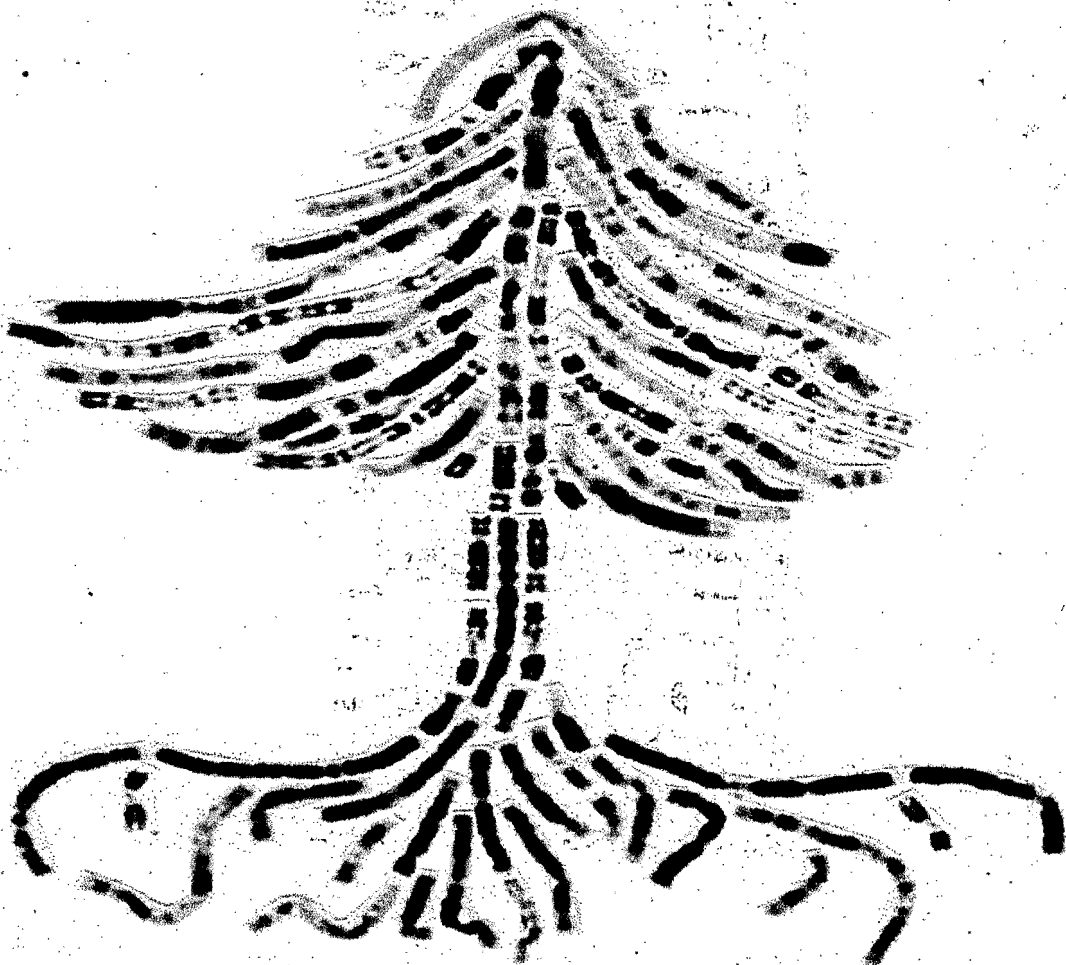


MODELO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO CROMOSOMICO EN CELULAS DE MAMIFEROS



Juan Bautista López Ortiz. Biólogo M.Sc.
María Elena Márquez Fernández. Bióloga M.Sc.

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA
BIBLIOTECA "LIFE" CO

MODELO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO CROMOSOMICO EN CELULAS DE MAMÍFEROS

Por

Juan Bautista López Ortiz. Biólogo M.Sc.

María Elena Márquez Fernández. Bióloga M.Sc.

**Profesores Asistentes
Escuela de Biociencias, Facultad de Ciencias**

**Trabajo propuesto como requisito para la promoción a la categoría de
PROFESORES ASOCIADOS**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE MEDELLÍN
FACULTAD DE CIENCIAS
2002**

UNAL-Medellín



6 4000 00151813 6

ESTECAS
FACULTAD DE CIENCIAS "513" COMBIZ

57200
L66

La carátula simboliza el árbol de la vida que en su follaje se muestra esplendorosa a nuestros ojos, mientras sus raíces nos presenta la dificultad que afrontamos cada vez que queremos profundizar sobre el enigma de su origen.

382226

Dedicatoria

A nuestras respectivas familias,
porque el tiempo dedicado a la
elaboración de esta guía fue
descontado de su tiempo.

Agradecimientos

Agradecemos muy especialmente a Luis Ernesto López Rojas, a Isleny Andrea Vanegas Córdoba y a José Carlos Menco González porque sin su valiosa colaboración, la guía hubiera salido des-figurada.

A Nana porque sin su aporte las figuras hubieran sido menos.

A Gemma porque sin su colaboración, la perspectiva no hubiera tenido comparación genómica.

A Neil porque sin su “nave” hubiera sido imposible el transporte de la letra al papel.

A Edna porque sin sus sugerencias la guía hubiera sido más corta.

CONTENIDO

	Página
Dedicatoria	i
Agradecimientos	ii
CONTENIDO	iii
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABLAS	ix
PRESENTACIÓN	1
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DE LA GUIA	5
CAPITULO 1. ANTECEDENTES DEL CONTEXTO CITOGÉNÉTICO ACTUAL	8
CAPITULO 2. BASES TEORICAS PARA EL ANÁLISIS CROMOSOMICO	13
2.1 GENERALIDADES SOBRE EL CICLO CELULAR.	13
2.1.1. Crecimiento y Desarrollo	14
2.1.2. Reemplazo de Células Muertas	14
2.1.3. Regeneración de Tejidos	15
2.1.4. Sistema Inmunológico	16
2.1.5. Formación de Gametos.	16
2.2. TIPOS DE CÉLULAS.	17
2.2.1. Células no cíclicas.	17
2.2.2. Células cíclicas o proliferativas	17

2.3. FASES DEL CICLO CELULAR.	17
2.3.1. Generalidades	17
2.3.2. La Interfase	18
2.3.2.1. Período G_1	19
2.3.2.2. Fase S	20
2.3.2.3. Período G_2	20
2.3.2.4. División Celular Mitótica	21
2.3.2.5. División Celular Meiótica	23
2.4. CONTROL DEL CICLO CELULAR	27
2.4.1. ¿Cómo funciona el Complejo Cdc 2-ciclina B que forman el FPM?	31
2.4.2. ¿Cuáles son los mecanismos moleculares que controlan la progresión de las diferentes fases del ciclo celular en una célula eucariótica?	32
2.4.3. ¿De qué depende que una célula se pueda dividir n veces?	35
2.4.3.1. La Proliferación	35
2.4.3.2. La Sobrevivencia	37
2.4.3.3. La Senescencia	37
2.4.3.4. La Muerte Celular	37
2.5. SINCRONIZACION CELULAR	33
2.5.1. Sincronía natural	38
2.5.2. Gradiente de Sedimentación o Clasificador de Células	39
2.5.3. Adhesión Celular o superficie de vidrio o plástico	39
2.5.4. Sustancias Inhibidoras de la progresión de una fase particular.	39
2.5.4.1. Sustancias Antimitóticas	40
2.5.4.2. Sustancias Inhibidoras de la fase S	40
2.5.4.3. Sustancias que bloquean en G_1 .	41
2.5.4.4. Deprivación de aminoácidos o factores de crecimiento.	41
3. CAPITULO 3. MODELO EXPERIMENTAL PARA EL ANÁLISIS CROMOSOMICO I.	44
3.1. PROCEDIMIENTOS CITOGENÉTICOS PARA EL ESTUDIO CROMOSÓMICO.	44
3.1.1. OBTENCIÓN DE EXTENDIDOS CROMOSÓMICOS.	44
3.1.1.1. Toma de muestra de sangre periférica en mamíferos.	46
3.1.1.2. Selección de Medios de Cultivo.	48
3.1.1.3. Suplementos de Medio.	48

3.1.1.4. Selección de Mitógenos	49
Protocolo de Extracto Crudo de Fitohemaglutinina.	50
3.1.1.5. Tiempo de cultivo.	51
3.1.1.6. Pulso Terminal de 2´deoxi-5´-bromodeoxiuridina (BrdU).	53
3.1.1.7. Selección antimitótico y tiempo de exposición a Colcemid vs Colchicina.	62
3.2. PROCESAMIENTO PARA OBTENCIÓN DE EXTENDIDOS CROMOSÓMICOS.	63
3.2.1. Protocolo de Obtención de Extendidos Cromosómicos a partir de una muestra de sangre periférica.	64
3.2.1.1. Procedimiento de cultivo	64
3.2.1.2. Procesamiento de los cultivos	64
3.2.1.3. Coloración homogénea	65
3.2.1.4. Coloración Diferencial de Bandas	65
3.2.2. Conservación de los extendidos cromosómicos y Búsqueda de la Mitosis de Interés.	66
3.2.3. Proceso Fotográfico	68
4. CAPITULO 4. MODELO EXPERIMENTAL PARA EL ANÁLISIS CROMOSOMICO II.	69
4.1. ELABORACIÓN DE UN CARIOTIPO	69
4.1.1. Cariotipo sin Bandas.	69
4.1.1.1. Conteo de Cromosomas.	71
4.1.1.2. Cálculo de Índice Centromérico.	72
4.1.1.3. Cálculo de Índice Braquial.	72
4.1.1.4. Cálculo de Longitud Relativa	73
4.1.2. Cariotipo con Bandas.	75
4.1.2.1. Bando Cromosómico en toda la Longitud del Cromosoma.	75
4.1.2.1.1. Bandas R-replicativas	77
4.1.2.1.2. Protocolo para Bandas R-replicativas	77
4.1.2.1.3. Bandas G.	82
4.1.2.1.4. Protocolo para Bandas G	83
4.1.2.1.5. Bandas Q	84
4.1.2.1.6. Protocolo para Bandas Q	84
4.1.2.2. Bando en sitios específicos de la Estructura Cromosómica.	84
4.1.2.2.1. Bandas C	85
4.1.2.2.2. Protocolo para Bandas C	86
4.1.2.2.3. Bandas G-C	87

4.1.2.2.4. Protocolo para Bandas G-C	87
4.1.2.2.5. Bandas G ₁₁	88
4.1.2.2.6. Bandas T	88
4.1.2.2.7. Bandas Cd	88
4.1.2.2.8. Regiones NOR (Regiones organizadoras del nucleólo)	90
4.1.2.2.9. Protocolo para Regiones NOR	91
4.1.3. SISTEMA DE NOMENCLATURA DE CROMOSOMAS BANDEADOS	92
4.1.3.1. Identificación y Definición de Marcadores, Regiones y Bandas	92
4.1.3.2. Designación de Regiones, Bandas y Subbandas	92
4.1.3.3. Bando de Alta Resolución	94
4.1.4. EJEMPLO DE UN TALLER DE CITOGÉNÉTICA	95
4.1.4.1. INDICES Y MEDIDAS MORFOMETRICAS DE LOS CROMOSOMAS	95
4.1.4.2. PROPUESTA DE CARIOTIPO	98
4.1.4.3. PARES CROMOSOMICOS HOMOLOGOS	98
4.1.4.4. GRUPOS CROMOSOMICOS PROPUESTOS	99
COMENTARIO FINAL	100
5. CAPITULO 5. PERSPECTIVAS DEL ANÁLISIS CROMOSOMICO.	103
5.1. CITOGÉNÉTICA MOLECULAR.	103
5.1.1. SONDAS CENTROMÉRICAS.	105
5.1.2. SONDAS TELOMÉRICAS.	106
5.1.3. SONDA DE SECUENCIA UNICA (SSU).	108
5.1.4. PINTADO CROMOSÓMICO O SONDAS PARA UN CROMOSOMA.	109
5.2. OTRAS PRUEBAS FISH.	110
5.2.1. Hibridación Genómica Comparada.	110
5.2.2. Cariotipo Espectral.	114
5.2.3. ASPECTOS TÉCNICOS DE LA FISH.	115
6. BIBLIOGRAFÍA DE REFERENCIA	117
ANEXO I.	122
ANEXO II	125
ANEXO III	126
ANEXO IV	127

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del ciclo celular	18
Figura 2. Fases del ciclo celular	19
Figura 3. Fases de la mitosis	23
Figura 4. Esquema de la meiosis	25
Figura 5. Fases de la meiosis I y II	25
Figura 6. Estados de la Profase I	26
Figura 7. Puntos de chequeo del ciclo celular	28
Figura 8. Estructura del Factor Promotor de la Maduración (FPM)	30
Figura 9. Mecanismo de la Regulación de Quinasas	32
Figura 10. Síntesis y Degradación de las Ciclinas	33
Figura 11. Grado de compactación de los cromosomas humanos en Tres fases distintas de la prometafase.	43
Figura 12. Esquema del Ciclo Celular con cada uno de los estadios replicativos	56
Figura 13. Estadios Replicativos de algunos cromosomas del genoma humano de linfocitos de sangre periférica utilizando pulso terminal de BrdU.	57
Figura 14. Cromosoma X en estadio III replicativo en diferentes grupos de mamíferos.	59
Figura 15. Cariotipo $2n=46XX$ humano. X inactivo.	60
Figura 16. Diversos cromosomas Y humanos. Asimetría lateral. Diferentes Polimorfismos.	61
Figura 17. Cromosoma Y en estadio III replicativo de diferentes grupos de Mamíferos.	61

Figura 18. Esquema de la dirección de rastreo en el portaobjetos con objetivo 10X y 40X para la búsqueda de extendidos cromosómicos analizables.	67
Figura 19. Cariotipo de <i>Dasyprocta sp.</i> 2n=66 con tinción homogénea	70
Figura 20. Cariotipo humano XY con coloración homogénea.	74
Figura 21. Cromosomas humanos con coloración homogénea organizados Según las normas del ISCN.	74
Figura 22. Cariotipo humano con bandas R-replicativas.	76
Figura 23. Cariotipo 2n=74 XX de <i>Agouti paca</i> .	78
Figura 24. Cariotipo 2n=50XY de <i>Bubalus bubalis</i> con bandas R-replicativas	79
Figura 25. Cariotipo 2n= 43-45 de <i>Alouatta seniculus</i> .	79
Figura 26. Aneuploidía Sexual humana 2n=45X	80
Figura 27. Heteromorfismo cromosómico en cariotipo 2n= 54 XX de <i>Cebus capuccino</i> .con bandas R-replicativas.	81
Figura 28. Fragilidad en el cromosoma 16 de un cariotipo humano.	81
Figura 29. Translocación cromosómica no Robertsoniana 4-5 de cariotipo humano.	82
Figura 30. Cariotipo humano 46XX con bandas G-tripsina	83
Figura 31. Bandas C en cariotipo de <i>Cebus capuccino</i>	85
Figura 32. Bandas C en cariotipo de <i>Agouti taczanowskii</i> .	78
Figura 33. Origen del cromosoma 2 humano por translocación Robertsoniana de cromosomas 12 y 13 de <i>Pan panicus</i> .	80
Figura 34. Translocación Robertsoniana humana 13-14.	81
Figura 35. Regiones organizadoras del nucléolo (RON)	82
Figura 36. Cariotipo de <i>Dasyprocta sp.</i> organizado por estudiantes	92
Figura 37. Cariotipo de <i>Dasyprocta sp.</i> organizado por estudiantes	93
Figura 38. esquema que representa los diferentes tipos de sondas FISH	104
Figura 39. Mitosis con sonda pancentromérica	106
Figura 40. Cromosomas humanos con sondas panteloméricas	107
Figura 41. Cromosomas humanos con sonda de secuencia única	108
Figura 42. Cromosomas humanos con sondas específicas de cada cromosoma o pintado Cromosómico.	109

Figura 43. Hibridación Genómica Comparada en cromosomas humanos	113
Figura 44. Cariotipo espectral de cromosomas humanos. (Tomado de Karp, 1999)	115

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Fases de la mitosis	22
Tabla 2. Fases y subfases de la meiosis I y II.	26
Tabla 3. Factores de Crecimiento y su acción específica.	36
Tabla 4. Tipos de Venas usadas para toma de muestra de sangre periférica	47
Tabla 5. concentraciones de anticoagulante y mitógeno utilizados en cultivos de células de mamíferos.	51
Tabla 6. Tiempo de ciclo, horas en BrdU y tiempo de antimitótico en Diferentes mamíferos.	53
Tabla 7. Clasificación de cromosomas por ubicación del centrómero	72
Tabla 8. Parámetros de medidas utilizadas para propuesta de un cariotipo $2n= 64XY$.	96 87

PRESENTACION

La presente guía teórica-práctica es una recopilación de una experiencia acumulada de al menos 8 años de trabajo experimental en la Sede Medellín respaldada por al menos 10 años de experiencia previa en el área de citogenética, del profesor Juan Bautista López Ortiz y aproximadamente 7 años de la profesora María Elena Márquez Fernández antes de llegar a la Sede .

La formación académica que poseemos ambos profesores desde el nivel de pregrado fue en citogenética humana principalmente y tanto las tesis de pregrado como las de nivel de maestría responden a esta orientación, además del manejo de ciclo celular de células de mamífero para realizar evaluaciones genotóxicas de drogas antineoplásicas usando métodos de bandeo cromosómico de alta resolución, estudio de estadios de replicación (cronología de la replicación) para estudiar la cinética proliferativa en células como los linfocitos humanos y en líneas celulares establecidas como las células CHO principalmente.

Desde nuestra llegada a la Sede Medellín (1993) y con la experiencia previa, rápidamente comenzamos a estudiar diversas especies animales mamíferas, comenzando a implementar y a enseñar todas nuestras experiencias a estudiantes de la Línea de Profundización en Genética y Biotecnología, en la cual se dicta desde esa época la asignatura *Citogenética*. Además, comenzamos a desarrollar investigaciones aprobadas por CINDEC, trabajos dirigidos de grado y proyectos conjuntos con otros profesores de la Facultad de Ciencias Agropecuarias principalmente en el grupo de Roedores Hystricomorfos (Guaguas, chiguiros, ñeques, etc.) que actualmente se mantienen en cautiverio en el establo de la Sede.

Por otro lado, para resolver algunas necesidades específicas del Zoológico Santafé de la ciudad de Medellín, se realizaron unos estudios de cariotipo citogenético en primates tipo *mono aullador* y tití con el fin de realizar caracterización citogenética para programas de reintroducción de mamíferos de vida silvestre.

Paralelamente se han realizado otros trabajos en pecaríes o cerdos americanos, además se han analizado otras especies de mamíferos domésticos tales como bovinos, cerdos y otros mamíferos de más reciente introducción en Colombia como los búfalos con gran potencial para aprovechamiento zootécnico. En estos proyectos se han realizado algunas pasantías de estudiantes de otras instituciones como el Colegio Mayor de Antioquia y la Universidad de Antioquia, se han realizado algunas publicaciones y otros artículos están en prensa. También se han

presentado en diversos congresos y seminarios específicos del tema en diferentes ciudades del país.

El documento propuesto, antes que ser un manual de laboratorio, pretende ser una guía teórica-práctica, que muestra *resultados originales* obtenidas en diferentes investigaciones realizadas en el Laboratorio de Citogenética de la Sede, unas veces en colaboración con otros investigadores o instituciones y otras desarrolladas de manera individual.

Los ejemplos aquí presentados son inéditos unos y otros se han publicado en algunos artículos sobre el tema o se han presentados en distintos eventos regionales o nacionales, pero en todo caso pretenden ilustrar los principales parámetros a tener en cuenta cuando un *investigador neófito* en el tema, quiere incursionar en él. En otras palabras, esta guía trata de llenar un vacío existente en la literatura con respecto a los criterios que se deben tener en cuenta para utilizar la citogenética como una herramienta importante para la clasificación taxonómica y caracterizar organismos utilizados en programas de aprovechamiento zootécnico y reintroducción de fauna silvestre.

En el documento, se registra a manera de tablas, cuadros, fotografías, figuras y esquemas, los resultados resumidos y más relevantes de muchas de las especies estudiadas en nuestro Laboratorio, lo cual ha sido un esfuerzo conjunto de ambos profesores, teniendo en cuenta las sugerencias de otros docentes y evaluadores en el momento de la realización de cada uno de los trabajos.

La guía, resume toda nuestra experiencia adquirida sobre los principales parámetros a tener en cuenta en diferentes especies de mamíferos con respecto a la toma de muestra, sitio de toma de muestra de sangre, concentraciones de anticoagulante, concentración de mitógeno, tiempo de ciclo, horas en presencia del análogo bromodeoxiuridina, tiempo de antimitótico, solución hipotónica, fijador, goteo, fotografía etc, utilizados en el protocolo convencional citogenético para la obtención de cromosomas humanos (Moorhead, 1960), los cuales deben ser estandarizados en cada una de las especies de mamíferos estudiada.

En resumen, la base teórica y experimental para obtener un cariotipo de una sola especie de mamífero ha implicado al menos una tesis de pregrado o una pasantía y en otros casos como el caso de una guagua de páramo la cual ha presentado inconsistencia en su ubicación taxonómica, ha generado tema para una tesis de maestría utilizando técnicas moleculares.

María Elena Márquez Fernández

Juan Bautista López Ortiz

Enero de 2002

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DE LA GUIA

La producción académica de un docente e investigador a veces es intangible, si no se logra consolidar un verdadero trabajo escrito que refleje su continuidad académica o demuestre la formación de jóvenes investigadores en el área de su desempeño.

En el área de la Biología, denominada Genética existen gran amplitud de temas donde cualquier biólogo o relacionado puede desarrollar investigación. Dentro de estas temáticas hay unas que resultan más atractivas por la disponibilidad experimental o bibliográfica etc. Pero otras, son de más difícil acceso por el grado de compromiso que representa, por el tiempo que debe pasar para obtener un resultado satisfactorio, además de la paciencia que se requiere para explorar, indagar, medir, comparar, etc.

El caso de la línea de investigación en Citogenética es un intermedio de todo lo anterior, es apasionante, llamativa, vislumbra, pero requiere dedicación y a veces hasta ingenio. No se pueden producir resultados por arte magia, sino que todo lo

que se dice o acepta debe ser demostrable, como todo lo del ámbito científico-técnico.

En el área de la Citogenética Convencional, no es fácil encontrar bibliografía que oriente de una sola vez cuáles son los principales parámetros para comenzar a investigar en esa temática, además se requiere un buen componente teórico, antes de llegar al campo experimental. Desde los años 60's, a partir de los cuales se observan los principales protocolos experimentales obtenidos en linfocitos de sangre periférica humana, se publican todas las modificaciones que van surgiendo en los diferentes organismos animales, pero no se conoce hasta el momento una guía básica que lleve de la mano a una persona a iniciar y al menos a elaborar un cariotipo completo con diferentes tipos de bandas que contribuyan a la caracterización de una especie.

Como profesores de las asignaturas de Biología Celular, Biología Molecular, Genética, Citogenética, Ingeniería Genética y Seminario de Biotecnología durante nueve años, nos hemos dado cuenta de las necesidades específicas de los estudiantes de la carrera de Zootecnia, aún de Ingeniería Agronómica y de Biología de otras universidades, para el aprendizaje de este modelo experimental.

Hace dos años y medio atrás nos dimos a la tarea de comenzar a hacer un plan de actividades que nos permitieran madurar la idea de consolidar una guía teórica-práctica sencilla pero clara con componentes cruciales que permitieran abordar este tema. Desde esa época este plan ha sufrido innumerables modificaciones, la

hemos revisado muchas veces, hemos introducido y eliminado temas con el fin de que quede lo más accesible posible tanto a un estudiante de pregrado como de posgrado.

El objetivo que nos ocupa en esta guía, es recopilar un poco la experiencia recorrida en el área de citogenética de mamíferos con el fin de que otras personas interesadas en el tema tengan un punto de partida a partir del cual iniciar un estudio cromosómico en cualquier especie de mamífero de la cual se conozcan o no reportes. El Modelo Experimental, se basa en la patrón de bandas R-replicativas, las cuales son el fuerte de la guía, sin embargo, puede ser utilizado para cualquier patrón de bandas o si el investigador lo prefiere para realizar un cariotipo sin bandas.

CAPITULO 1

1. ANTECEDENTES DEL CONTEXTO CITOGENÉTICO ACTUAL.

El estudio de los cromosomas a través de la cariología o la citogenética ha ocupado un lugar importante en varias áreas de la genética, especialmente en clínica y ha tenido aplicaciones académicas en biología comparativa y en estudios filogenéticos. Desde 1888 se introdujo el término cromosoma por Wilhelm Waldeyer, luego se formuló la teoría cromosómica de la herencia por Theodore Boveri, Walter Sutton y Thomas Morgan en la primera parte del siglo.

La historia del desarrollo de la investigación citogenética se puede dividir en períodos de acuerdo a las principales innovaciones tecnológicas que contribuyeron a la propuesta de diversos procedimientos analíticos (Hsu, 1979). Antes de 1950, la citogenética se enfocó en el estudio de cromosomas humanos en secciones de testículos de individuos muertos, las cuales eran fijadas y embebidas en parafina, luego fragmentadas en muestras delgadas y examinadas bajo el microscopio de luz. Con esta metodología se estimó en 48 cromosomas el

número diploide humano, similar al encontrado en nuestro pariente cercano el chimpancé.

La época moderna de la citogenética comenzó con el desarrollo de cuatro principales logros tecnológicos que fueron el sustrato para el desarrollo de las actuales técnicas de la citogenética molecular.

El primer avance para obtener cromosomas mitóticos de piel y bazo, se logró accidentalmente por el uso de la solución hipotónica antes de la fijación cromosómica, la cual permitió obtener extendidos mitóticos en los que se podía evaluar fácilmente el número y la morfología cromosómica. Luego, la combinación de la hipotónica más la utilización de la colchicina como agente antimitótico permitió mejorar y aumentar el número de células en metafase.

Posteriormente se comenzó a usar tejidos vivos tales como médula ósea, biopsias de piel embriones cultivados en líquido amniótico y linfocitos obtenidos de sangre periférica estimulados por fitohemaglutinina con lo cual se podían obtener juegos cromosómicos visibles a través del microscopio de luz. Estos procedimientos permitieron realizar cultivos a gran escala a partir de sólo muestras de sangre.

El segundo avance tecnológico fue el desarrollo de las técnicas de bandeo cromosómico que permitieron la identificación de cromosomas homólogos (dentro de cariotipos de la misma especie) y cromosomas homeólogos (entre cariotipos de diferentes especies). Para el desarrollo de las técnicas de bandeo, se requirieron

avances técnicos basados en estudios de microdensitometría de células y tejidos utilizando colorantes fluorescentes como la naranja de acridina y posteriormente con la mostaza de quinacrina con la cual se logró el primer bandeo cromosómico, las bandas Q y luego de otros avances en degradación diferencial de cromatina e introducción de bases análogas a la estructura del DNA, con lo que se desarrollaron otros tipos de bandeos, tales como el G, G₁₁, C, C_d, R y el R-replicativo.

Evans y sus colegas desarrollaron la técnica de acético-salina-Giemsa (ASG) la cual generó un bandeo transversal denominado bandeo G. A partir de su mejora, resultó el bandeo G de alta resolución y alternativamente surgió el bandeo R-replicativo valioso para la identificación de cromosomas de alta resolución en especies donde por diferentes razones no se puede inducir el bandeo G. El bandeo R-replicativo es una técnica basada en los patrones asincrónicos constantes de la replicación de los cromosomas, siguiendo la cronología de la duplicación del genoma.

El tercer avance tecnológico fue el desarrollo de la técnica de hibridación *in situ* utilizando sondas de DNA que se unían a cromosomas particulares o a partes de ellos y que permitieron localizar secuencias específicas. El cuarto avance tecnológico, tiene que ver con el uso de la inmunoquímica junto con la hibridación *in situ*, lo cual permitió la detección no radiactiva de la hibridación de sondas con varios fluorocromos en un proceso conocido como coloración específica de

cromosomas usado para mapear secuencias en los cromosomas y para identificar la homología cromosómica entre especies (sintenia).

El campo de la citogenética molecular se comenzó a desarrollar con la técnica de la hibridación *in situ* de ácidos nucleicos usando sondas radiactivas y no radiactivas. Su principal uso ha sido en estudios comparativos con secuencias repetitivas (DNA satélite), estudios de grupos de genes ribosomales, genes reduplicados de cromosomas politénicos, para localizar transcriptos de RNA específicos en cromosomas plumosos y para localizar secuencias de DNA de copia única en cromosomas mitóticos.

Actualmente, la citogenética molecular utiliza sondas biotilinas no radiactivas visualizadas con anticuerpos monoclonales o policlonales o sondas fluorescentes (FISH) son marcados con fluorescencia. Todos estos métodos pueden ser acoplados a software, los cuales ofrecen mayor especificidad, resolución y versatilidad que la autorradiografía, método muy utilizado en estudios moleculares clásicos. Otras técnicas que ofrecen mayor resolución son la microscopía con láser focal o microscopía electrónica de transmisión.

Los métodos descritos, hacen de la citogenética molecular una herramienta poderosa para estudiar a nivel evolutivo, taxonómico y reproductivo cualquier especie de la cual se puedan obtener excelentes extendidos cromosómicos.

La presente guía pretende llenar un vacío en la literatura disponible sobre los principales parámetros a tener en cuenta en el estudio cromosómico de especies de mamíferos. Por ello, propone un modelo experimental que permita a un investigador nuevo en el tema abordar de manera adecuada un estudio cromosómico en cualquier especie de mamífero.

CAPITULO 2

2. BASES TEÓRICAS PARA EL ANÁLISIS CROMOSÓMICO.

2.1 GENERALIDADES SOBRE EL CICLO CELULAR.

El ciclo celular es un conjunto de eventos biofísicos, bioquímicos y biológicos que conducen a una célula a duplicar su material genético y citoplasmático acompañado de una división en células hijas. Por ejemplo, a través del ciclo celular, los organismos unicelulares cumplen con diversos objetivos uno de ellos es la reproducción, lo cual es muy importante para la perpetuación y evolución de la especie. En los organismos pluricelulares, la realización de un ciclo celular puede deberse al cumplimiento de diversas funciones celulares tales como crecimiento y desarrollo, reemplazo de células muertas, regeneración de tejidos, formación de gametos, entre otras.

Brevemente se explican cada una de las razones por las cuales un organismo pluricelular puede realizar ciclo celular.

2.1.1. Crecimiento y desarrollo. Un organismo pluricelular se origina cuando un cigoto formado por fusión de dos gametos (masculino y femenino), por el desarrollo de un óvulo no fecundado (partenogénesis) o por clonación de una célula somática, realiza ciclos celulares sucesivos formando tejidos, órganos y sistemas a través de complejos procesos de diferenciación celular.

Por medio de la división celular, los organismos pluricelulares logran cantidades inimaginables de células dependiendo de su tamaño. Si se compara el volumen y tamaño de una pulga con un ratón, un avestruz, un ser humano, un elefante, una ballena, o con el árbol de secolla que alcanza hasta 45 metros de diámetro, se observa una relación entre el crecimiento y el desarrollo con el número de ciclos celulares realizados por cada individuo.

Se puede estimar el número de ciclos celulares requeridos para la formación de un individuo a partir de un cigoto con el número estimado de células (**# células**), por medio de la siguiente fórmula: $m \times 2^n = \text{\#células}$, donde **m**= número inicial de células que contiene el cigoto y **n**= número de ciclos celulares realizados. En el caso del ser humano, se estima que el número de células es de 10^{14} , por lo tanto el número de ciclos es 51.

2.1.2. Reemplazo de células muertas. Las células de la mayoría de tejidos deben ser reemplazadas de manera dinámica a través de su ontogenia. En casos como las plantas, las células muertas no funcionales se acumulan constituyendo la

madera, mientras que en los organismos animales como los mamíferos las células muertas son eliminadas.

Por ejemplo, en el tejido sanguíneo de mamíferos, mueren alrededor de tres millones de glóbulos rojos cada segundo, los cuales deben ser reemplazados mediante igual número de divisiones celulares efectuadas en la médula ósea. En otros tejidos como la piel, el tracto gastrointestinal, nódulos linfáticos, folículo piloso y las gónadas se realizan muchos ciclos celulares permanentemente que sumada a la producción de glóbulos rojos podrían superar los veinte millones de divisiones por segundo.

2.1.3. Regeneración de tejidos. De acuerdo a su grado de diferenciación y a la ubicación en la escala evolutiva, los organismos y las células que forman los tejidos de sus órganos, al ser lesionados o fraccionados se pueden regenerar efectuando ciclo celulares. Esta regeneración podría variar desde la producción de un nuevo organismo como en el caso de la planaria y muchas plantas hasta la formación de un órgano como en el caso del cangrejo o la generación de una simple cicatrización en organismos como el ser humano.

De acuerdo al grado de diferenciación, las células de los tejidos pueden responder o no de manera diferencial al proceso de regeneración mediante ciclos celulares. Por ejemplo, las neuronas son altamente diferenciadas y no se pueden regenerar, mientras que las células del hígado si pueden regenerar $\frac{2}{3}$ del total.

del órgano. La capacidad que poseen las células de un tejido para generar un nuevo organismo a partir de una célula o de un grupo de ellas se denomina *totipotencia celular*.

2.1.4. Sistema inmunológico. En los mamíferos, el sistema inmune está formado por diferentes tipos de células, responsable de la inmunidad celular y humoral. En la inmunidad celular, los linfocitos T aumentan su población ante la presencia de un agente extraño o antígeno el cual se convierte en un agente inductor de ciclo celulares (agente mitogénico). Este principio, se utiliza para la obtención de cromosomas a partir de sangre periférica, en el que se usa como mitógeno una lectina denominada fitohemaglutinina extraída del frijol común (*Phaesus vulgaris*).

2.1.5. Formación de gametos. Los organismos mamíferos para su reproducción sexual producen células gaméticas en sus tejidos gonadales mediante una división celular llamada *meiosis*, la cual consiste en dos divisiones celulares sucesivas con reducción a la mitad (n) del número $2n$ de estructuras cromosómicas visibles al microscopio y de la cantidad c de material genético. En este caso a partir de una célula podrían generarse teóricamente, cuatro células gaméticas.

2.2. TIPOS DE CÉLULAS.

Teniendo en cuenta las razones anteriores, las células o tejidos que realizan o no ciclo celular, se pueden agrupar en dos grandes categorías:

2.2.1. Células no cíclicas, aquellas que en condiciones normales, no realiza ciclo celular. Por ejemplo, las neuronas, células del sistema nervioso de mamíferos y en general tejidos altamente diferenciados.

2.2.2. Células cíclicas o proliferativas aquellas que debido a su papel en el organismo o en circunstancias especiales, efectúan ciclos celulares. Por ejemplo organismos unicelulares, tejidos meristemáticos, cambium vascular de plantas, los tejidos embrionarios de animales y plantas, los tejidos gonadales, órganos hematopoyéticos, la piel y el tracto gastrointestinal.

2.3. FASES DEL CICLO CELULAR.

2.3.1. Generalidades

El ciclo de división de una célula eucariótica, consta de cuatro procesos secuenciales: crecimiento en volumen o tamaño, duplicación del material genético (ADN), distribución de los cromosomas en las células hijas y división celular. De acuerdo a la visualización bajo el microscopio de luz, una célula se puede

clasificar dependiendo del estado de ciclo en dos fases principales: **interfase** (célula con núcleo) y **mitosis** (célula con cromosomas) (Figura 1).

2.3.2. La interfase. se puede definir como una etapa de gran actividad biológica en la que el material genético en forma de cromatina se encuentra disperso en el núcleo y en el cual se da la replicación y transcripción del DNA. Por otro lado, la interfase se puede subdividir en tres periodos denominados G_1 , S y G_2 (Figura 1).

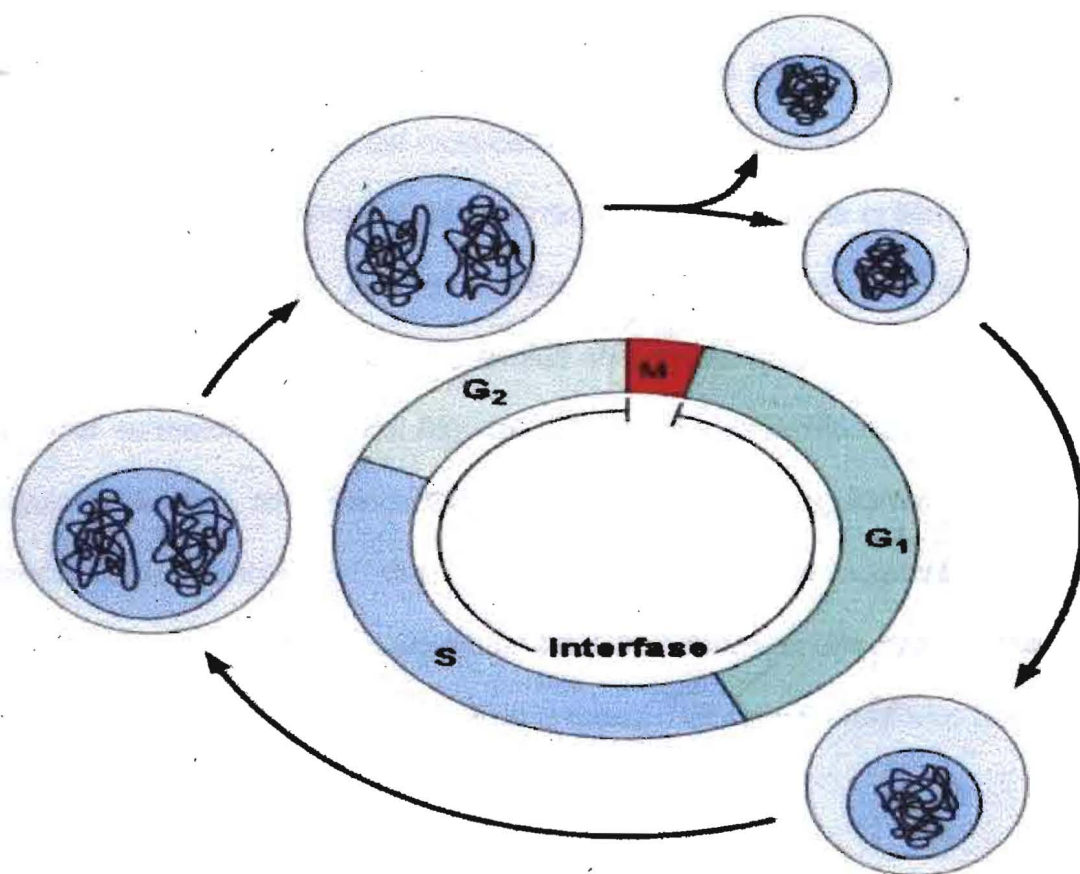


Figura 1. Esquema del ciclo celular. (Tomado The Cell, Cooper, 2000)

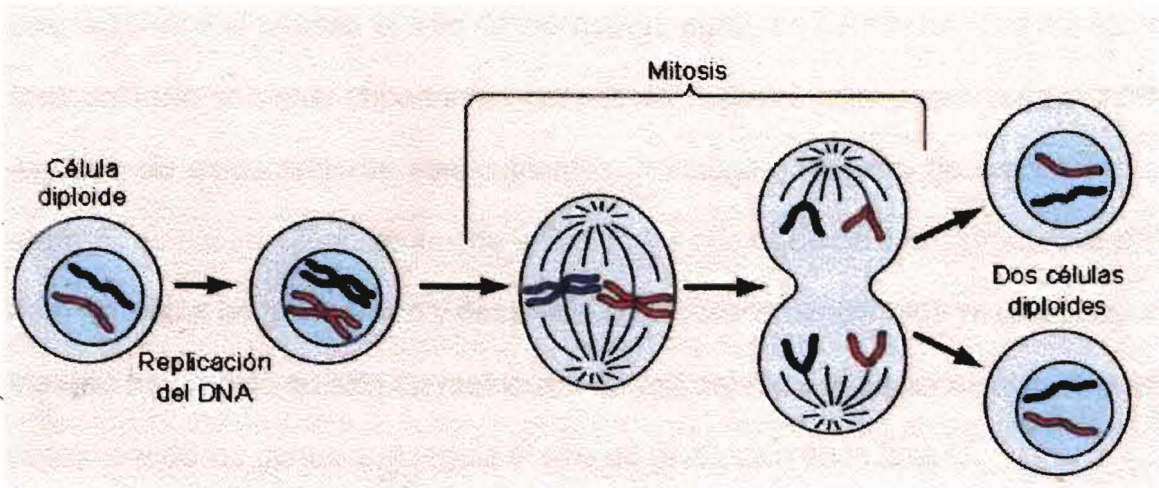


Figura 2. Fases del ciclo celular. (Tomado The Cell, Cooper, 2000)

2.3.2.1. Período G_1 . Al comparar distintos tipos de células de mamífero, es el período más heterogéneo del ciclo celular. En condiciones normales, puede variar desde fracciones de hora, promedios de 5 a 8 horas, hasta el tiempo de vida de una célula diferenciada, período G_0 . En la fase G_1 se encuentra el denominado *sitio de restricción*, en el cual se evalúa si la célula tiene condiciones o no para duplicar su material genético. Algunas condiciones limitantes de la progresión a la siguiente fase S son: concentraciones adecuadas de nucleótidos, factores de crecimiento, aminoácidos, daño genético y espacio que ocuparán las nuevas células hijas, entre otros. Si alguno de los parámetros mencionados no cumple los requisitos, podría ser causa para que la célula o un cultivo de células permanezca en G_1 de manera indefinida.

Los factores que afectan el sitio de restricción, punto de partida hacia la siguiente fase del ciclo son muy importantes cuando se realizan cultivos celulares *in vitro*. Algunos de estos factores son nutrientes, hormonas, factores de crecimiento y enzimas quinasas dependientes de la ciclina los cuales se ha demostrado que son determinantes en la iniciación y desarrollo de procesos cancerosos ya que el tejido maligno ha perdido su sitio de restricción tal vez debido a mutaciones ocurridas en cualquiera de los genes que regula el sitio de restricción en la fase G_1 .

2.3.2.2. Fase S. La duración promedio para este período en células de mamífero es de 6 a 8 horas y es particular para cada especie y tejido. Es un período en el cual ocurre la duplicación de replicones tempranos y tardíos contenidos en el material genético. En los replicones tempranos se duplica la eucromatina rica en citosinas y guaninas ($G=C$), genéticamente activa. En la parte terminal del período S se duplica la heterocromatina constitutiva rica en adeninas y timinas ($A=T$), genéticamente inactiva y la heterocromatina facultativa la cual es altamente regulada en la expresión génica, como sucede con el cromosoma X inactivo en las hembras de mamíferos.

2.3.2.3. Período G_2 . La duración promedio de este período en células de mamíferos es de 2 a 3 horas. Está comprendido entre el final de la fase S y el inicio de la fase mitótica y la célula se prepara para condensar el material genético en estructuras compactas observables al microscopio de luz, denominados

cromosomas mitóticos. En esta fase la célula efectúa una serie de controles para chequear entre otros aspectos, la duplicación total del material genético y la integridad del genoma referido a la presencia de daño. Este punto de chequeo se denomina de *no retorno* y también es mediado por enzimas quinasas dependiente de ciclinas.

2.3.3. División Celular Mitótica. Es una serie continua de eventos que conducen a que el material genético ya duplicado se reparta con precisión en las células hijas. La fase mitótica dependiendo de los grados de condensación y compactación cromosómica visualizados a través del microscopio, se dividen en cuatro etapas: prometafase, metafase, anafase y telofase (Figura 3). En la Tabla 1 se hace una breve descripción de los eventos más importantes que se llevan a cabo en cada una de estas etapas de la mitosis.

En cultivo *in vitro* de células y tejidos, si se adiciona un antimitótico al cultivo tales como colchicina o colcemid, las células en etapas mitóticas pueden avanzar desde prometafase hasta metafase donde pueden permanecer un promedio máximo de 7 horas, tiempo en el cual se observa que la célula continúa al siguiente ciclo de una forma caótica. Por esta razón para lograr extendidos cromosómicos de buena calidad no se recomienda bloquear la célula en esta fase por tiempos mayores de 4 horas.

Tabla 1. Fases de la Mitosis.

PROMETAFASE	<ol style="list-style-type: none"> 1. Los cromosomas formados por dos cromátidas inician su proceso de compactación para formar los cromosomas metafásicos. 2. La envoltura nuclear y el retículo endoplásmico se fragmentan en vesículas. 3. Se ensambla el huso mitótico y los microtúbulos se fijan al cinetocoro de cada cromátida que forma la diada, lo que genera el desplazamiento de los cromosomas hacia la zona ecuatorial de la célula.
METAFASE	<ol style="list-style-type: none"> 1. Los cromosomas se alinean a lo largo de la placa metafásica, unidos por microtúbulos a ambos polos del huso mitótico. 2. Los cromosomas alcanzan su máximo estado de compactación, relación de 1:10.000 con relación a la interfase.
ANAFASE	<ol style="list-style-type: none"> 1. Las cromátidas hermanas que forman las díadas de los cromosomas metafásicos se separan sincrónicamente y migran a polos opuestos por acortamiento de las fibras del huso acromático que están unidas a cinetocoro.
TELOFASE	<ol style="list-style-type: none"> 1. Los dos grupos de cromosomas hermanos llegan a los polos. 2. Se ensambla la envoltura nuclear alrededor de los cromosomas agrupados, fenómeno llamado cariocinesis. 3. Se reconstituye el retículo endoplásmico. 4. Se divide el citoplasma en dos células hijas, fenómeno denominado citocinesis

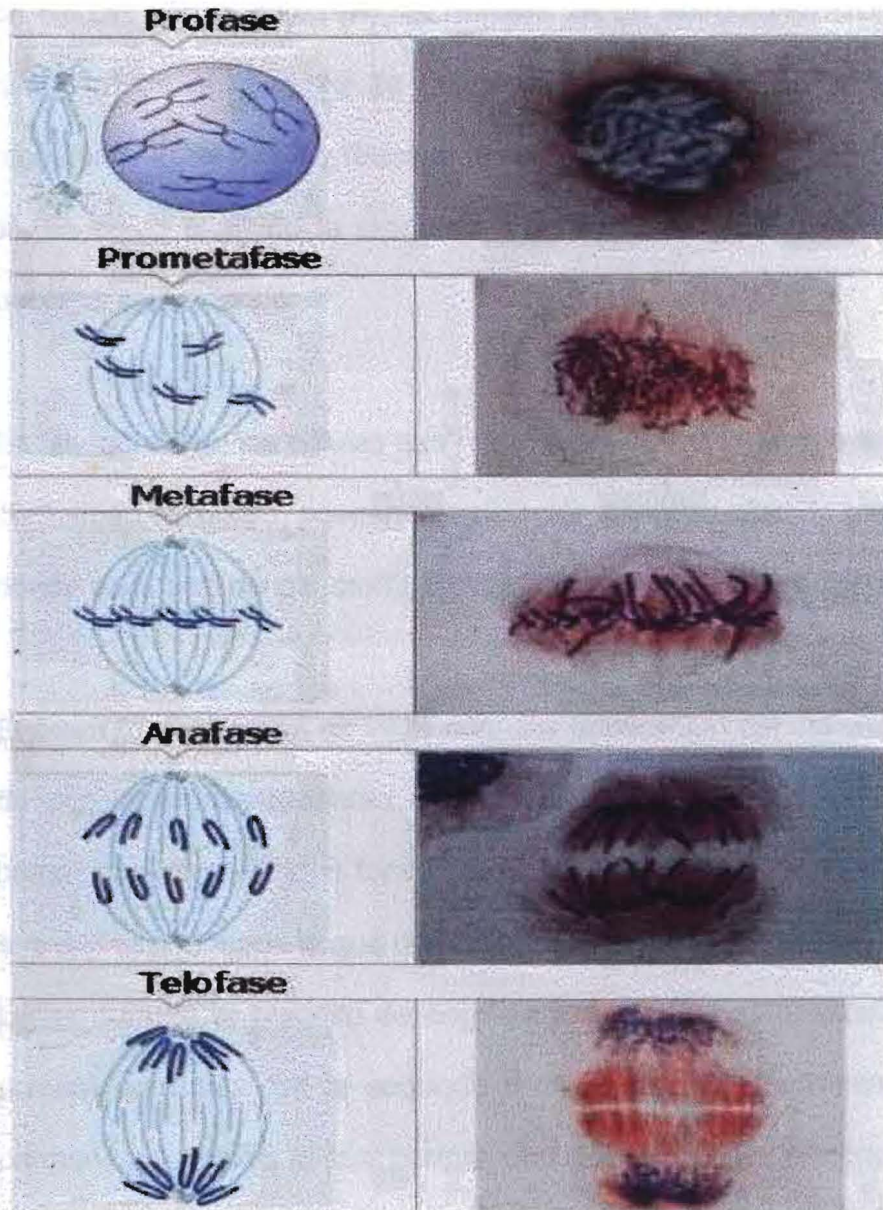


Figura 3. Fases de la Mitosis. (Tomado The Cell, Cooper, 2000)

2.3.4. División Celular Meiótica. Es un tipo de división celular que se lleva a cabo en organismos multicelulares o en organismos unicelulares que son diploides en alguna fase de su ciclo de vida. La meiosis tiene como propósito la producción

de células con la mitad (n) del número $2n$ de estructuras cromosómicas y de la mitad (c) de la cantidad $2c$ de contenido de ADN. En el caso específico de mamíferos este tipo de división celular se realiza en tejidos llamado gónadas y tienen como finalidad la producción de gametos ya sean espermatozoides u ovocitos secundarios.

En las gónadas, las células que realizan meiosis al igual que todas las demás que conforman el cuerpo, poseen una dotación genética diploide (pares homólogos) en donde cada uno de los cromosomas provienen de padres diferentes.

El proceso de meiosis se inicia con una duplicación del material genético seguido de dos divisiones celulares sucesivas. En la primera división los cromosomas homólogos como díadas forman tétradas, las cuales mantiene activo sólo uno de sus dos centrómeros lo que determina que las cromátidas hermanas permanezcan juntas durante el proceso de segregación a diferentes células hermanas en la primera anafase. En la segunda división los dos centrómeros de cada díada permanecen activos lo cual permite una división celular semejante a lo ocurrido en mitosis, por lo tanto cada cromátida hermana se segrega a células diferentes. De esta manera, un gameto sólo hereda una copia de cada par homólogo ya sea de origen materno o paterno (Figuras 4 y 5).

En la Tabla 2, se resumen las fases y subfases de la meiosis I y de la meiosis II anotando los eventos más importantes en cada caso.

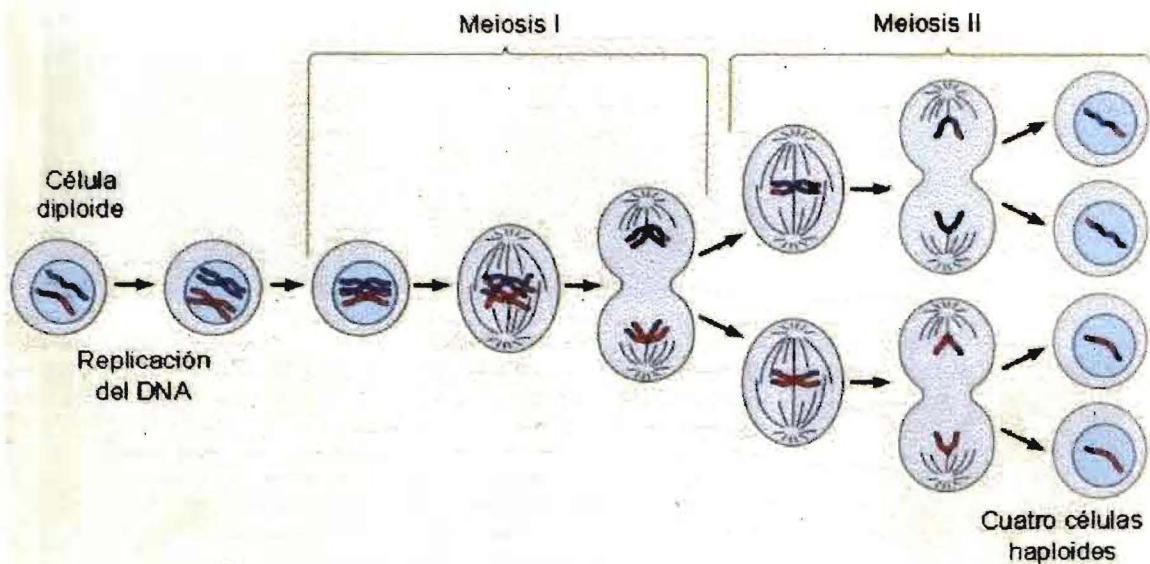


Figura 4. Esquema de la Meiosis. (Tomado The Cell, Cooper, 2000)

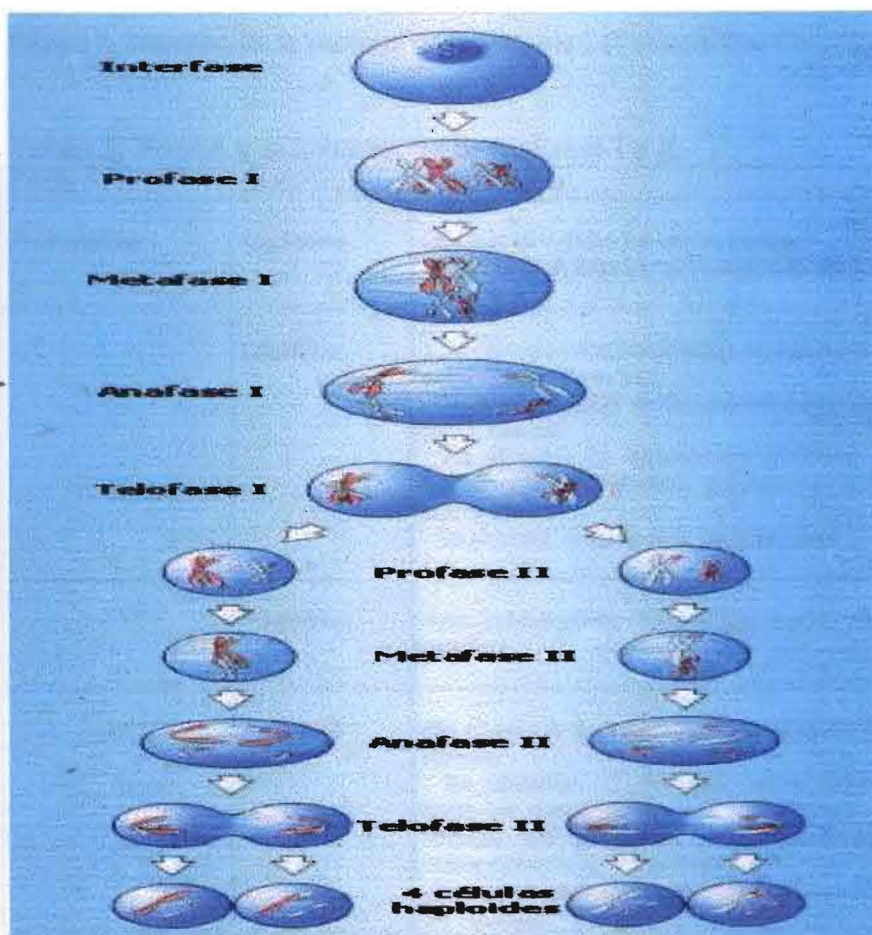
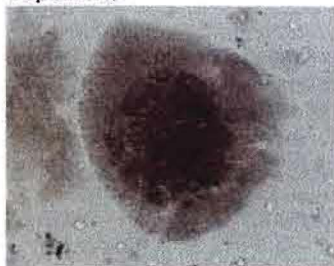


Figura 5. Fases de la meiosis I y II (Tomado de The Cell, Cooper 2000)

Leptotene



Cigotene



Paquitene



Diptotene



Diaquinesis



Figura 6. Estados de la profase de la meiosis I. (Tomado The Cell, Cooper, 2000)

Tabla 2. Fases y subfases de la meiosis I y II.

FASE	SUBFASE	EVENTO(S)
Prometáfase I	Leptotene	<ul style="list-style-type: none"> - Se hacen visibles los cromómeros. - Se observan áreas engrosadas a lo largo del cromómero
	Cigotene	<ul style="list-style-type: none"> - Los cromosomas homólogos se aparecen formando estructura determinada tétradas. - La zona de unión molecular entre cromosomas homólogos se llama sinapsis. - En el caso de organismos híbridos los cromómeros no homólogos permanecen sin aparearse formando estructuras monovalentes. - Se observa el número n de la especie
	Paquitene	<ul style="list-style-type: none"> - Los cromosomas homólogos están alineados en toda su longitud.
	Diptotene	<ul style="list-style-type: none"> - Se observan sectores desaparecidos en algunos factores de la tétrada. - Se observan uniones entre cromátides no hermanas llamadas quiasmas. - Donde existen zonas quiasmáticas se pueden realizar entrecruzamiento entre homólogos. - Se incrementan sustancialmente el grado de compactación de las tétradas.

Continúa Tabla 2. Fases y subfases de la meiosis I y II

Metafase I	<ul style="list-style-type: none"> -Ha desaparecido la membrana nuclear. -Las tétradas se localizan en el plano ecuatorial. -El centrómero activo de cada diada se une a las fibras del huso en polos opuestos.
Anafase I	<ul style="list-style-type: none"> -Cada diada que forma la tétrada se dirige a polos opuestos.
Telofase I	<ul style="list-style-type: none"> -Los cromosomas en cada polo genera la intercinesis -Se puede o no formar la membrana nuclear. -Las células resultantes poseen sólo un cromosoma homólogo de cada par, por lo que se le denomina fase reducional.
<i>MEOSIS II</i>	
Prometafase II	<ul style="list-style-type: none"> - Se observan un n número de diadas.
Metafase II	<ul style="list-style-type: none"> - Los cromosomas en forma de diadas se disponen en el plano ecuatorial.
Anafase II	<ul style="list-style-type: none"> -Las cromátidas hermanas son arrastradas hacia los polos opuestos por las fibras del huso.
Telofase II	<ul style="list-style-type: none"> - Se forma la membrana nuclear alrededor de los cromosomas y finalmente se forma las células gaméticas.

2.4. CONTROL DE CICLO CELULAR.

El conocimiento que permite entender cómo una célula llega a dividirse se ha obtenido a través de una serie de experimentos realizados en oocitos y embriones tempranos de ranas y varios invertebrados, complementados con estudios genéticos en levaduras.

La división de toda célula es cuidadosamente regulada con el fin de garantizar que las células hijas reciban una dotación genética igual a la célula madre. La progresión de una célula eucariótica a través del ciclo está regulada por señales externas e internas expresadas en las diferentes fases del ciclo. En otras palabras, los diferentes períodos del ciclo en las cuales se chequea la progresión, están reguladas en puntos estratégicos de tal manera que en G_1 se determina la progresión hacia la fase S y en G_2 se controla la entrada a mitosis (Figura 7).

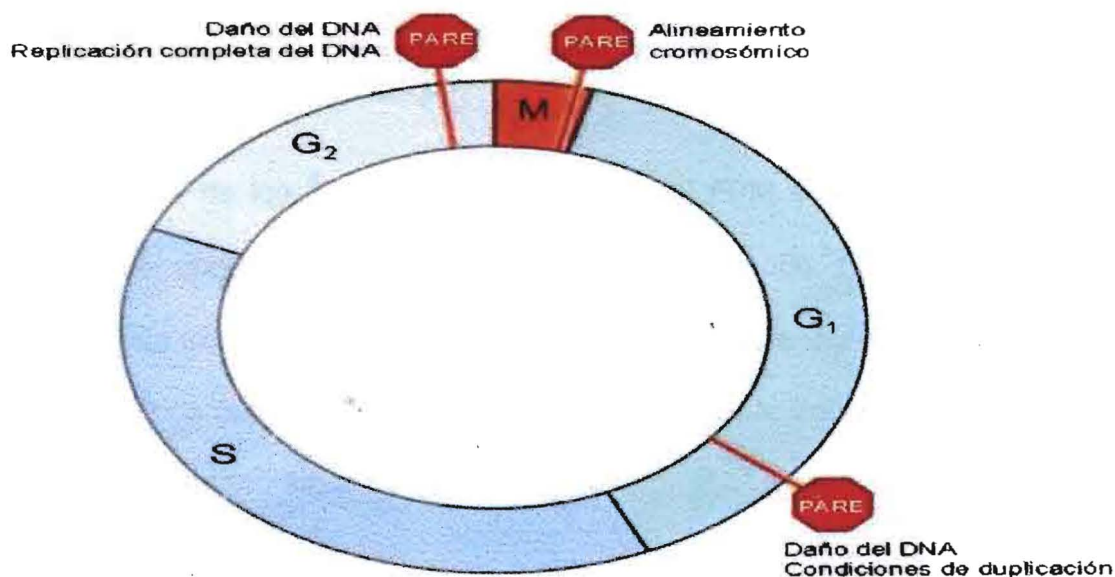


Figura 7 . Puntos de chequeo del ciclo celular. (Tomado The Cell, Cooper 2000)

Las señales extracelulares que regulan la proliferación celular en mamíferos denominados *factores de crecimiento* participan fundamentalmente en la progresión de la célula hacia el sitio de restricción en G_1 . La ausencia de ellos

induce a la célula a permanecer en G_0 , de la cual sólo puede continuar el ciclo si se suplementa con los factores de crecimiento. Se ha mostrado una fuerte correlación entre la presencia de factores de crecimiento y la síntesis de la ciclina D para las etapas tempranas del ciclo celular.

Inicialmente, se demostró que oocitos inhibidos en G_2 , podían ser inducidos a la mitosis mediante inyecciones de un factor citoplasmático obtenido de un oocito previamente estimulado con hormonas, lo cual era capaz de pasar la transición de G_2 a mitosis. A ese factor, se le denominó factor promotor de la maduración (FPM) y también se demostró que está presente en células somáticas en división.

En la década de los 80's, se demostró que el FPM estaba formado por dos polipéptidos: uno con función reguladora (ciclina β) y otro con función catalítica (Cdc2). Este último factor es el encargado de la transferencia del grupo fosfato del ATP a residuos específicos de aminoácidos tales como, treonina, tirosina y serina presentes en las proteínas quinasas (Figura 6).

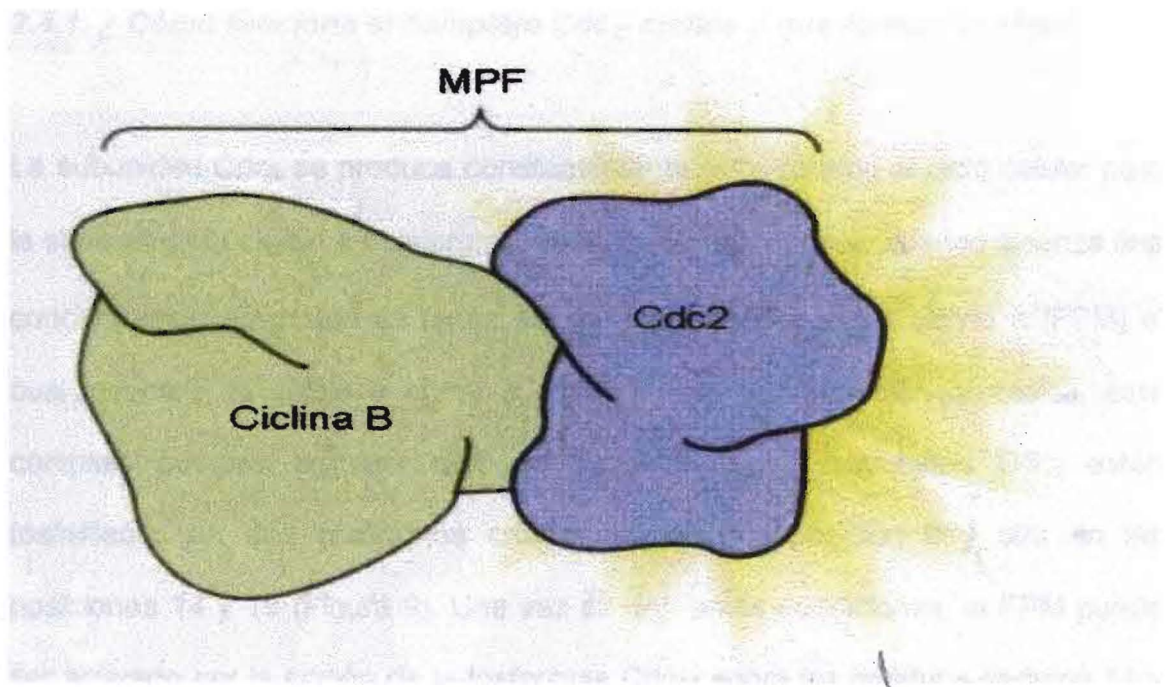


Figura 8. Estructura del Factor Promotor de la Maduración (FPM). (Tomado The Cell, Cooper, 2000)

De un lado, el *sitio de restricción en G1*, somete a control, parámetros como tamaño celular, nutrientes, daño genético, presencia de hormonas y factores de crecimiento entre otros. De otro lado, el punto de chequeo G_2 o *sitio de no retorno*, se encarga de verificar la duplicación completa del ADN y su integridad. En un tercer lugar, se encuentra otro punto importante de chequeo realizado al final de la metafase, que controla la distribución equitativa del material genético en las células hijas, en el cual se verifica la alineación correcta de los cromosomas para asegurar su correcta distribución en las células hijas.

2.4.1. ¿Cómo funciona el complejo Cdc₂- ciclina β que forman el FPM?

La subunidad Cdc₂ se produce constantemente durante todo el ciclo celular pero la síntesis de la ciclina β comienza al inicio de la fase S y sólo cuando alcanza una concentración adecuada se forma el complejo dimérico Cdc₂- ciclina β (FPM) el cual induce a la célula a entrar a mitosis. Para su activación quinásica, este complejo además requiere que las treoninas de la subunidad Cdc₂ estén fosforiladas en dos posiciones críticas: una en la posición 6 y otra en las posiciones 14 y 15 (Figura 9). Una vez se dan estas condiciones, el FPM puede ser activado por la acción de la fosforilasa Cdc₂₅ sobre los residuos treonina 14 y 15.

El complejo activo de Cdc₂-ciclina β induce a la célula a entrar a la fase mitótica, por medio de una serie de reacciones de fosforilación y con la transferencia del grupo fosfato a las láminas de la envoltura nuclear. Una vez transcurre la mitosis, el FPM activa la degradación de la ciclina β mediada por la ubiquitina hasta umbrales bajos de concentración tal que la célula termina la mitosis (Figura 10).

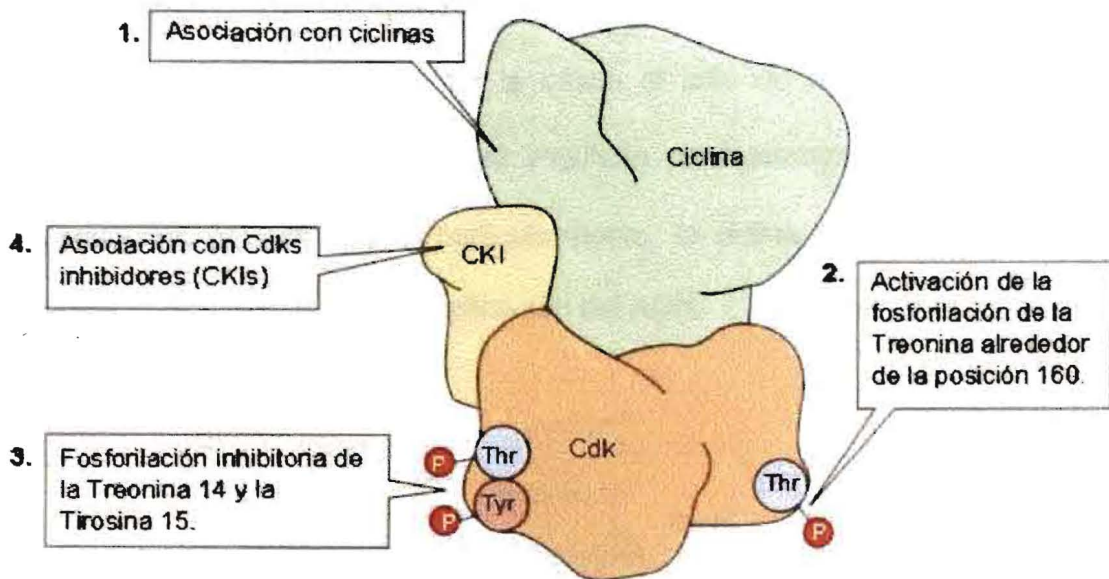


Figura 9. Mecanismo de regulación de las quinasas dependientes de ciclina (Cdks). (Tomado The Cell, Cooper, 2000)

Recientemente se ha demostrado que la Cdc₂ y la ciclina β hacen parte de una gran familia de proteínas relacionadas y conservadas a nivel evolutivo, que controlan el paso a través de las distintas fases del ciclo celular. En células de mamífero, se les denomina quinasas dependiente de ciclinas (Cdks) que serían similares al FPM.

2.4.2. ¿Cuáles son los mecanismos moleculares que controlan la progresión a través de las diferentes fases del ciclo celular en una célula eucariótica?

En general, los sitios de control están mediados por proteínas quinasas dependientes de ciclinas que actúan en diferentes combinaciones dependientes

del sitio (Figura 7). Por ejemplo, el complejo Cdk₂, Cdk₄, Cdk₆ y ciclina D juegan un papel crítico en la llegada de la célula al sitio de restricción en G₁ y la progresión de G₁ a la fase S está regulada principalmente por Cdk₂ y Cdk₄ asociadas con ciclinas D y E particularmente, la ciclina E es importante en la transición G₁/S y el inicio de la duplicación del ADN.

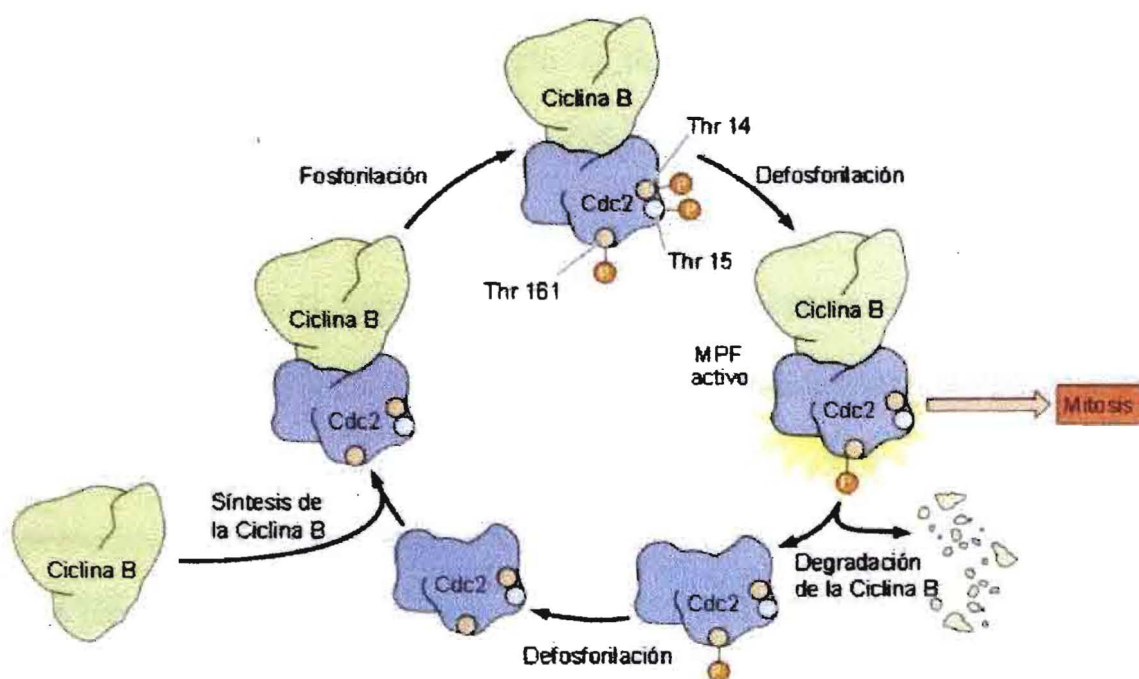


Figura 10. Síntesis y degradación de las proteínas ciclinas. (Tomado The Cell, Cooper, 2000)

La formación del complejo Cdk-ciclina está determinado por la biosíntesis y degradación de la ciclina (Figura 10), la activación depende de su fosforilación de un residuo específico treonina 6 por una Cdk activadora de quinasas compuesta por Cdk7-ciclina H. Este complejo activado se asocia con el factor de transcripción TFII del RNAm de la RNA polimerasa II, también involucrado en el proceso de

reparación del DNA y en la transcripción. Este complejo Cdk-ciclina es tan importante para la vida de la célula que participa en tres actividades distintas: en la transcripción, en la reparación del DNA y en la regulación del ciclo celular.

Otros factores externos que influyen en la progresión del ciclo celular de G_1 a S son los agentes que causan daño en el DNA, ya que la célula debe repararlo antes de continuar la división. Por ejemplo, la proteína p^{53} induce la síntesis de la proteína p^{21} la cual inhibe el complejo Cdk-ciclina. Otro ejemplo de inhibidores de la proliferación celular en tejidos epiteliales animales es el factor β -TGF el cual detiene la célula en G_1 temprana porque estimula la síntesis de las proteínas p^{15} y p^{27} , la cual bloquea el complejo Cdk- ciclina D debido a que evita la llegada al sitio de restricción. Otra señal que puede detener la progresión de una célula proliferativa normal en cultivo *in vitro* es la inhibición por contacto de las células que crecen adheridas a una superficie en un espacio limitado como un frasco de cultivo.

En células de tejido nervioso y músculo esquelético permanecen detenidas en estado G_0 durante días, meses o años porque los sistemas moleculares que controlan el ciclo celular como los Cdks y las ciclinas, se disminuyen o desaparecen.

2.4.3. ¿De qué depende que una célula se pueda dividir n veces?

El número de células que determina el tamaño de los organismos multicelulares o las poblaciones celulares de diferentes tejidos especializados, depende de un programa genético que involucra mecanismos de proliferación, supervivencia y muerte celular y senescencia.

2.4.3.1. La proliferación en organismos multicelulares depende de señales como factores de crecimiento los cuales pueden provenir de otras células y se unen a receptores de superficie quienes transmiten la señal al interior celular y estimula la división celular a través del complejo Cdk-ciclina. Por regla general, las células animales que crecen en cultivo requieren la combinación de factores de crecimiento específicos de tal manera que con un número relativamente pequeño de factores de crecimiento podrían ser suficientes para inducir proliferación en células de diferentes tejidos. En la Tabla 1 se muestran algunos factores de crecimiento y su acción específica.

El cáncer por ejemplo, es una afección que altera órganos y tejidos de organismos multicelulares y se manifiesta con una proliferación continua de células que nunca padecen la senescencia. El origen del cáncer se localiza en mutaciones de genes que de una forma u otra están implicados en el control del ciclo celular. Existen dos categorías de genes que promueven el cáncer: genes que codifican proteínas involucradas en la división celular normal y los que codifican productos

antiproliferativos y los genes supresores de tumores que participan normalmente en la represión de productos inductores de la proliferación. De la misma manera una mutación en un gen puede producir sobreexpresión de una proteína que genera multiplicación celular. A ese gen mutado se le denomina *oncogen* mientras que al gen versión normal se le denomina *protooncogen*.

Tabla 3. Factores de crecimiento y su acción específica.

FACTOR DE CRECIMIENTO	EFFECTOS
Factor de crecimiento derivado de plaqueta (PDGF)	Estimula la proliferación de células de tejido conectivo.
Factor de crecimiento epidermal (FGE)	Estimulan la proliferación de diferentes tipos de células (piel y embrionaria)
Factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1)	Promueve la supervivencia, estimula el metabolismo. Colabora con otros factores para estimular la proliferación celular.
Factor β de crecimiento transformante (TGF- β). Múltiples subtipos.	Potencia o inhibe la respuesta de la mayoría de células a otros factores de crecimiento. Regula la diferenciación de algunos tipos células.
Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)	Estimula la proliferación de muchos tipos de células. Inhibe la diferenciación de muchos tipos de células.
Interleukina-2 (IL-2)	Estimula la proliferación del linfocito T activado.
Factor de crecimiento nervioso (NGF)	Promueve la supervivencia y la permanencia en Go de los tipos específicos de neuronas.
Interleukina (IL-3)	Estimula la proliferación y la supervivencia de células precursoras de distintos tipos de células sanguíneas.
Eritropoyetina	Promueve la supervivencia, proliferación y diferenciación de los precursores de los glóbulos rojos sanguíneos.

2.4.3.2. La sobrevivencia o la capacidad de sobrevivir de una célula depende de la edad, de la especie y de la programación genética de un organismo para dividirse un determinado número de veces. Por ejemplo, se estima que los fibroblastos de un feto humano sólo puede realizar alrededor de 80 ciclos celulares, mientras que los fibroblastos de un organismo adulto sólo podrían realizar 40 ciclos.

2.4.3.3. La senescencia o la pérdida de capacidad para dividirse e involucra eventos como acortamiento de telómeros y acumulación de inhibidores o pérdidas de Cdks. Por esta razón, en cultivos celulares *in vitro*, es recomendable implementar protocolos que permitan obtener líneas celulares establecidas que sean inmortales o líneas que puedan ser mantenidas y replicadas de manera continua sin llegar a la senescencia, utilizadas para fines experimentales particulares.

2.4.3.4. La muerte celular programada o apoptosis es el resultado de la activación de un programa genético de suicidio que ocurre durante el desarrollo embrionario y en tejidos adultos. Por ejemplo, durante el desarrollo embrionario en el sistema nervioso una forma de regular el número de células en el tejido, es mediante la muerte de más o menos la mitad de células. Otros ejemplos, en el desarrollo fetal, el delineamiento de las regiones interdigitales de los dedos de las manos y de los pies y la desaparición de la cola durante la metamorfosis de

anfibios. En tejidos adultos como el epitelio de la piel, del tracto gastrointestinal y el tejido sanguíneo mueren cada segundo millones de células, por apoptosis.

Cuando una célula muere de un daño agudo, típicamente se hincha, se revienta y derrama su contenido sobre la célula vecina la cual reacciona favorablemente al estímulo suicida controlado por una familia de proteasas, se colapsa el citoesqueleto, se desensambla la envoltura nuclear y se fragmenta el ADN causando la *necrosis celular*, en un área de tejido aledaño.

2.5. SINCRONIZACIÓN CELULAR.

Para realizar estudios celulares en una fase específica del ciclo celular como G, S, G2 o M, se requiere obtener un número grande de células de la fracción de interés, por lo tanto, es recomendable implementar estrategias que permitan detener las células en la fase del ciclo requerida sin causar mayores perturbaciones en el metabolismo celular que impida la progresión a las siguientes fases.

2.5.1 Sincronía natural. Por ejemplo, los embriones de erizo de mar conservan su sincronía natural en todas las fases del ciclo en las tres primeras divisiones.

Utilizando este principio se pueden obtener bajo condiciones controladas de laboratorio grandes cantidades de embriones que inician su división de manera sincrónica.

2.5.2 Gradiente de Sedimentación o Clasificador de Células. Se pueden obtener al menos dos fracciones celulares correspondientes a G_1 y G_2/M .

2.5.3 Adhesión celular a superficie de vidrio o plástico. Las células de mamíferos cultivables, generalmente se vuelven esféricas cuando llegan a la fase mitótica lo cual permite que se desprendan fácilmente de manera mecánica a través de un golpe suave. Si esta fracción se siembra en condiciones óptimas de cultivo *in vitro*, las células continúan de 2 a 3 ciclos de manera sincrónica.

Las células que crecen adheridas a una superficie pueden permanecer en G_1 una vez se agote el espacio donde ellas crecen. El tiempo que puede permanecer una célula en esa fase G_1 es relativamente largo, pero depende del tipo de línea, del tejido y de la especie. A muy largo plazo, se puede afectar la viabilidad celular.

2.5.4 Sustancias inhibidoras de la progresión de una fase particular del ciclo.

Teniendo en cuenta el efecto de las sustancias en cada una de las fases los podemos clasificar en los siguientes grupos:

2.5.4.1 Sustancias antimitóticas. Ejercen su acción interfiriendo con los componentes del huso mitótico bloqueando los componentes de la β -tubulina o la depolimerización de la fibra del huso. Dentro de estas sustancias se encuentran varios alcaloides como son la colchicina, vinblastina, vincristina, taxol, colcemid. Estas sustancias son usados como medicamentos puros o mezclas para tratamiento de neoplasias. La colchicina y el colcemid han sido tradicionalmente usados como antimitóticos en los procedimientos para la obtención de extendidos cromosómicos ya que son excelentes bloqueadores de la fase mitótica y no altera significativamente el grado de compactación de la estructura cromosómica.

2.5.4.2 Sustancias inhibidoras de la fase S. Intervienen bloqueando la síntesis de DNA a nivel de la síntesis de nucleótidos o interfiriendo con las polimerasas. A este grupo de sustancias pertenecen la arabinósido de citosina (ara-C), metotrexate (MTX), 5-fluoruracilo (5-FU), entre otros. El MTX y el 5-FU son interesantes porque inducen una acumulación parcial en la parte subterminal de la fase S punto en el que termina de duplicarse la eucromatina y comienza a duplicarse la heterocromatina constitutiva y facultativa. Este bloqueo puede ser liberado fácilmente por la incorporación vía exógena del nucleósido de timidina o su análogo 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdUrd). Por esta razón, estas dos sustancias son utilizadas como agentes sincronizadores para la obtención de bandas R-replicativas.

2.5.4.3 Sustancias que bloquean en G_1 . Las concentraciones altas de deoxitimidina puede inducir bloqueo en la fase G_1/S y en toda la fase S en un primer ciclo de replicación, si las células son liberadas durante un tiempo equivalente a la fase S y se realiza un segundo bloqueo toda la población celular queda detenida en el límite G_1/S . Este es uno de los métodos menos traumáticos para obtener células en esta fase.

2.5.4.4. Deprivación de aminoácidos o de factores de crecimiento. Otro método recomendable que acumula células en G_1 , sin embargo este método no produce poblaciones homogéneas en el límite G_1/S sino células distribuidas a lo largo de toda la fase G_1 .

A nivel citogenético, para realizar la sincronización celular de un cultivo *in vitro*, es importante conocer el punto de bloqueo ocasionado por un determinado compuesto en una fase particular del ciclo. Lo anterior permite determinar después de liberado el bloqueo el tiempo requerido para que la célula progrese hasta la mitosis con el fin de obtener un número significativo de células. En la prometafase, por ejemplo, se pueden obtener extendidos cromosómicos con un bandeo de alta resolución.

En nuestra experiencia hemos estandarizado la obtención de extendidos cromosómicos en prometafase, dependiendo de los objetivos del experimento. En la figura 8 se muestran tres niveles de compactación de cromosomas que

muestran los diferentes tipos de bandas que se pueden resolver. Por ejemplo, un cromosoma en prometafase inicial (Figura 11A) es útil cuando se quieren chequear microdeleciones, un cromosoma en prometafase intermedia (Figura 11B) se usa fundamentalmente para evaluar translocaciones crípticas (escondidas) y metafase propiamente dicha para evaluar aneuploidías (Figura 11C).

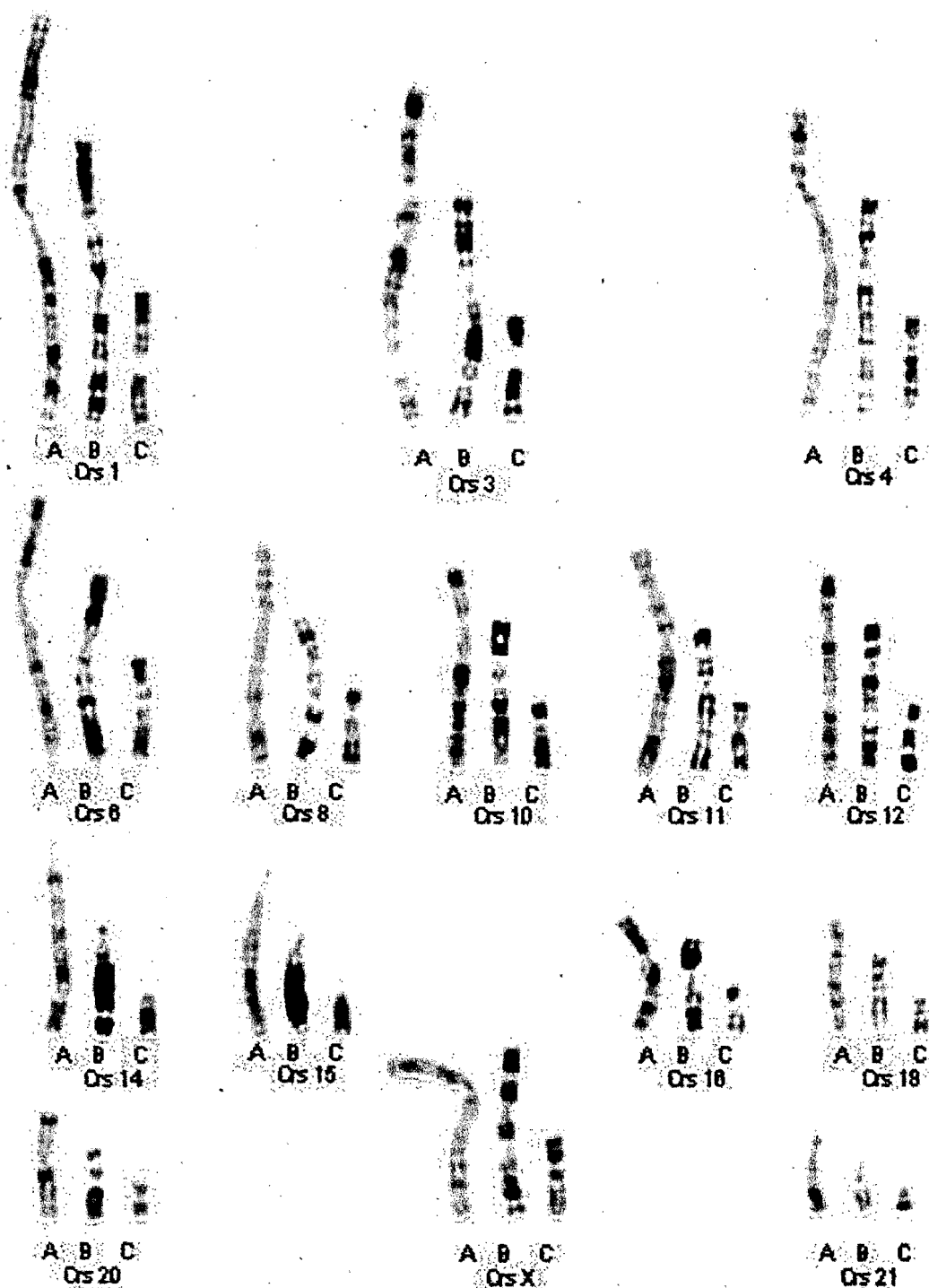


Figura 11. Grado de compactación de los cromosomas humanos en tres fases distintas de la profase-metáfase. (A) Prometáfase inicial, (B) prometáfase intermedia y (C) metafase, utilizando bandeo R-replicativo (Laboratorio Citogenética la Sede).

CAPITULO 3

3. MODELO EXPERIMENTAL PARA EL ANÁLISIS CROMOSOMICO I

3.1. PROCEDIMIENTOS CITOGENETICOS UTILIZADOS PARA ESTUDIOS CROMOSOMICOS.

3.1.1. OBTENCION DE EXTENDIDOS CROMOSOMICOS.

Una placa o portaobjetos con extendidos cromosómicos se puede obtener a partir de diferentes tipos de células y tejidos, tales como, médula ósea, biopsia de piel, de pulmón, renal, etc o de cultivo *in vitro* de diferentes células o tejidos como médula ósea, linfocitos de sangre periférica, células embrionarias, tejido gonadal, entre otros. En el caso de los mamíferos, se utilizan principalmente los linfocitos de sangre periférica por la facilidad en la obtención de la muestra, la disponibilidad del protocolo de cultivo y la facilidad en el procesamiento de la muestra.

Otra ventaja que tiene el cultivo de sangre periférica es que los linfocitos T contenidos en ella, pueden ser estimulados en cultivo *in vitro* a entrar a la fase proliferativa utilizando una lectina de origen vegetal inductora de la división celular. Una vez estimulados, los linfocitos T pueden dividirse durante varias generaciones las cuales son requeridas en los protocolos de incorporación de BrdU para la obtención de bandas R-replicativas. Lo anterior, también es aplicable a otros tipos de bandeo como el G y el C en los cuales se requiere una adecuada estructura cromosómica y un buen número de mitosis.

En el Laboratorio, se han estudiado individuos distintos de alrededor de 17 especies de mamíferos, en diferentes proyectos de investigación. Algunas de las especies evaluadas son: cerdos, bovinos búfalos, equinos, humanos, roedores histicomorfos, primates, ovinos, caprinos, conejos, pecaríes, caninos, entre otros.

Para asegurar el éxito de un cultivo celular *in vitro*, es necesario conocer las principales normas de higiene que se deben aplicar a todo laboratorio de experimentación.

El joven investigador debe practicar las normas de higiene seguidas en su vida diaria. Por ejemplo para iniciar cultivos todo el material de vidrio o plástico usado en cualquier procedimiento debe estar completamente estéril, si hay dudas sobre ello, es mejor volverlo a esterilizar.

Los elementos o sustancias usadas en el cultivo, deben cumplir con los procedimientos conocidos de esterilización dependiendo de su naturaleza. En ningún caso, se puede ensayar a criterio del joven aprendiz, ya que esto conduce a fracasos inminentes. En otras palabras, requiere de un entrenamiento previo.

Brevemente, se resumen los diferentes parámetros que se deben tener en cuenta para la obtención de extendidos cromosómicos de alta resolución, con el fin de construir un cariotipo.

3.1.1.1. Toma de sangre periférica en mamíferos. Al iniciar un estudio en una especie de mamífero dada, lo primero es asesorarse de un especialista en la anatomía animal, con el fin de seleccionar la vena más fácil de punzar y que haga menos traumático para el animal la toma de la muestra. Una vez seleccionado el sitio de sangrado, se deben tener todas las precauciones requeridas de asepsia con el fin de no contaminar la muestra.

Las diferentes venas usadas para el sangrado del animal en los diferentes estudios realizados en nuestro Laboratorio se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Tipos de venas usadas para toma de muestra en sangre periférica de mamíferos.

ORGANISMO	VENA
Humanos	Radial
Bovinos y Equinos	Yugular y Safena
Roedores (guaguas)	Lo equivalente a Safena
Roedores pequeños	Punción cardíaca
Primates	Femoral
Roedores pequeños.	Punción cardíaca
Cerdos – Ovejas	Yugular o femoral o radial
Chivos	Safena o yugular

Para la toma de la muestra, también es muy importante la concentración del anticoagulante usado. En general, el más utilizado es la heparina (Liquemine) a una concentración de trabajo de 5000 UI (en humanos), la cual está disponible a nivel comercial en una ampollita de 5 ml que contiene 25.000 UI. Esta concentración también requiere evaluación previa, ya que no todas las especies responden de la misma manera al anticoagulante. En algunos casos, las concentraciones menores de 5000 UI pueden dar resultados excelentes en la calidad de los cromosomas. En otros casos, como en la guagua loba (*Dynomis branickii*) o en el búfalo de río (*Bubalus bubalis*) se pueden requerir concentraciones mayores de 5000 UI. Visualmente se puede chequear el efecto del anticoagulante en la muestra de sangre como tal o durante el desarrollo del cultivo celular incubado a 37°C.

Otros anticoagulantes como el EDTA o el citrato, usados en el laboratorio clínico no permiten una adecuada estimulación de los linfocitos T para la obtención de extendidos cromosómicos de buena calidad. Por lo tanto, no se deben utilizar en el modelo experimental para la obtención de extendidos cromosómicos en mamíferos.

En resumen, a cada especie de mamífero se le debe estandarizar la concentración de la heparina utilizada en la toma de la muestra de sangre periférica, porque las altas concentraciones en algunos casos pueden resultar citotóxicas y las bajas concentraciones pueden causar coagulación de la muestra. En ambos casos se obtienen extendidos de mala calidad.

3.1.1.3 Selección de medios de cultivo. Si no se conoce el reporte bibliográfico, nosotros iniciamos con medio enriquecido (RPMI 1640 y Ham's F-12). En los medios mínimos como MEM esenciales no hemos encontrado buena estimulación y los cromosomas son de estructura relativamente débiles, entonces son difíciles de evaluar visualmente.

3.1.1.3. Suplementos de medios. En nuestra experiencia, el suero bovino fetal (SBF) y el suero de recién nacido (SRN) son los mejores suplementos. En

ocasiones no se requiere su uso en cultivos estimulados y cultivados en medios enriquecidos, pero se pueden usar bajas concentraciones (5-10%) dependiendo del objetivo. La diferencia principal entre SBF y SRN radica en que el primero es suplemento de factores de crecimiento mientras el segundo es suplemento de nutrientes y además es más barato. En ningún caso el SBF estimula el ciclo celular en linfocitos de sangre.

3.1.1.4. Selección de mitógenos. Los más usados son las lectinas vegetales concaavalina A o fitohemaglutinina se pueden adquirir de manera comercial u obtener a partir de extractos crudos procesados en el Laboratorio. Nuestra experiencia ha demostrado que la preparación de un extracto crudo de fitohemaglutinina a partir de frijol cargamanto seco (*Phaseolus vulgaris*) es el mejor estimulador de diferentes subpoblaciones de linfocitos contenidos en la sangre. Hasta ahora, todos los linfocitos T de mamíferos cultivados en el Laboratorio responden en mayor o menor proporción al estímulo de esta lectina. En cada caso hay que estandarizar la concentración ideal para esa especie partiendo de un protocolo original de extracción de la lectina, utilizando el protocolo presentado abajo.

La ventaja que tiene el extracto crudo de fitohemaglutinina con respecto a la que se adquiere comercialmente, es que esta última es una sola lectina purificada,

mientras que en el extracto se encuentra un grupo de lectinas que aumentan la probabilidad de estimular linfocitos T en especies no estudiadas.

Protocolo Preparación Extracto Crudo de Fitohemaglutinina.

- Se toman 20 grs de frijol cuidando que no tengan manchas o lesiones producidas por patógenos.
- Se sumergen en 100 ml de solución salina 0.9% durante 24 horas a temperatura ambiente.
- En un vidrio de reloj y con la ayuda de bisturí y pinza de garra, se le quita la cáscara y se cortan en finas rodajas.
- Se macera con la ayuda de un mortero en solución salina, hasta obtener una solución homogénea.
- Se vierte el macerado en un beaker hasta completar 100 ml.
- Esta solución se centrifuga a 10.000 r.p.m durante 30 minutos. Se toma el sobrenadante y se repite el paso anterior por 2-3 veces hasta lograr una solución libre de sólidos.
- Se diluye en solución salina a concentraciones de 10%, 20% y se filtra en miliporo y se almacena a -20°C .

Para iniciar un estudio citogenético en una especie desconocida, inicialmente se deben evaluar diferentes concentraciones a partir del extracto crudo, antes de decidir cuál es la concentración con la cual se va trabajar durante todo el experimento. En nuestro laboratorio, se han estandarizado para cada una de las diferentes especies de mamíferos estudiadas, las concentraciones de

fitohemaglutinina adecuadas para cada caso, las cuales se relacionan en la siguiente tabla.

Tabla 5. Concentraciones de anticoagulante y mitógeno utilizadas en cultivos de células de mamíferos.

ORGANISMO	(μ l) Liqueimine *	(μ l) MITOGENO **
Humanos	25	20
Bovinos y Equinos	25	50
Guagua (<i>Dynomis</i>)	50	70
Guagua (<i>Agouti</i>)	25	50
Primates	25	20
Cerdos y Ovejas	25	20
Búfalos	50	50
Pecaríes	50	50-70
Cabra	25	20

* Solución de trabajo 5000 UI/ml

** Extracto crudo de Fitohemaglutinina al 50%

3.1.1.5. Tiempo de cultivo. Cada especie de mamífero, responde de manera diferente a las lectinas como se puede ver en las distintas concentraciones reportadas en la Tabla 5. Esto determina que la muestra cultivada se pueda procesar al segundo, tercer o cuarto día después de iniciado el cultivo dependiendo de la respuesta al mitógeno y del tiempo de generación para realizar un ciclo celular (Tabla 6).

Al iniciar el estudio de una especie, se debe estandarizar el tiempo de cultivo apropiado para la obtención de extendidos cromosómicos que permitan realizar el

bandeo R-replicativo, principalmente, el cual es dependiente de la incorporación del análogo BrdU durante una fase del ciclo celular (fase S).

Los otros protocolos de bandeo no requieren un tiempo exacto de cultivo pero si requiere al menos un buen índice mitótico (**IM**) que puede ser mayor de 1.0. El índice es la resultante entre el número de mitosis contadas sobre el número de células totales, multiplicados por 100, según la siguiente fórmula:

$$\text{IM} = \frac{\text{\# células mitóticas}}{\text{\# células totales}} \times 100$$

Los tiempos de cultivo que se pueden ensayar inicialmente pueden estar entre 48, 54, 60, 66 y 72 horas de cultivo, tomando de referencia el tiempo de cultivo de linfocitos humanos que es el más estudiado. Si en estos rangos, no se obtienen los resultados esperados, se chequean tiempos mayores de 72 horas, hasta 94 horas, que es el tiempo límite de división de un linfocito en cultivo. Una vez establecido el tiempo donde se obtengan buen índice mitótico con buenas estructuras cromosómicas se toma como tiempo de referencia para ese organismo.

Tabla 6. Tiempo de ciclo (horas), horas en BrdU y tiempo de antimitótico en diferentes individuos mamíferos.

ESPECIE DE MAMÍFERO ESTUDIADA	Tiempo de cultivo (Horas)	Pulso terminal de BrdU (Horas)	Tiempo en antimitótico (min)
<i>Sus scrofa</i> (cerdo)	60	5.0	30
<i>Agouti taczanowskii</i> (guagua de páramo)	72	7.5- 8.0	40
<i>Agouti paca</i>	70	7.0	30 -60
<i>Equus caballus</i> (equinos)	60-72	6.0	30
Cabra, ovejo domésticos	60	7.0	30
<i>Hidrochaeris hidrochaerous</i> (chiguero)	72	6.0	30
<i>Alouatta seniculus</i> (primate)	60	6.0	30- 45
<i>Cebus capucinus</i> (primate)	66	6.5	30
<i>Saimiri sciureus boliviensis</i> (tití)	60	6.0	30
<i>Bos taurus</i> (bovino)	60-70	6.0	30
<i>Pecari tajaccus</i> (cerdo salvaje)	72	6.0	30-60
<i>Bubalus bubalis</i> (búfalo)	66-70	7.0	60
<i>Homo sapiens</i> (humano)	56	6.0	30

* Colcemid (10ug/ml) o colchicina (0.04%)

3.1.1.6. Pulso terminal de BrU para Bandas R-replicativas. En la Tabla 6 se relacionan los pulsos de tiempo de exposición del cultivo al BrdU, obtenidos para los diferentes organismos estudiados en nuestro laboratorio. Como se muestra, el pulso de BrdU para obtener estadio III de la fase S de replicación (que es el ideal para evaluar bandas R-replicativas) varía entre las especies de mamíferos y está relacionado con la duración de los períodos G₂ y S del ciclo celular.

Este tiempo de incorporación de BrdU es un punto crucial que se debe estandarizar en el protocolo experimental de cada organismo que se pretende

evaluar, ya que de ello depende el estadio de replicación para la evaluación de las bandas. Por lo tanto, al iniciar el experimento se deben realizar ensayos iniciales comenzando con 4, 5, 6, 7 y 8 horas de exposición a BrdU antes del procesamiento del cultivo, teniendo como referencia la duración en linfocitos humanos. En nuestra experiencia, se observa gran variabilidad en distintas especies, por ejemplo, en cerdos el tiempo ideal es de 5 horas, mientras que en guaguas puede llegar a ser de 8 horas de exposición a BrdU (Tabla 6).

Estos tiempos de exposición a BrdU también son importantes cuando se desea evaluar la cinética proliferativa de los linfocitos con el fin de determinar la duración de las fases del ciclo o el tiempo promedio de ciclo. Mediante esta técnica, en la fase S del ciclo, se pueden determinar 6 estadios replicativos: cuatro estadios corresponden a la fase S, uno a la fase G_1 y otro a la fase G_2 .

Brevemente, se describen, el significado de cada uno de los estadios replicativos en la cronología de la replicación del genoma humano. En la Figura 12, se muestra la ubicación aproximada de cada uno de los estadios de replicación sobre el esquema del ciclo celular.

Estadio VI: corresponde a la población de células que en el momento de agregar el BrdU se encontraban en la fase G_2 del ciclo celular.

Estadio V: corresponde a la población de células que están ubicadas en la última fracción de la fase S y a punto de entrar a G_2 en el momento de agregar BrdU.

Estadio IV: corresponde a la población de células que están ubicadas en el último tercio de la fase S, en el momento de agregar el análogo.

Estadio III: se encuentra la población de células en las que ha transcurrido la mitad de la fase S, en el momento de agregar el análogo. En este estadio, se ha duplicado el genoma en las regiones correspondientes a las bandas R-replicas (las cuales colorean oscuras con Giemsa) y faltan por duplicar las bandas G (las cuales colorean claras con Giemsa). Esta es la razón por la cual este estadio es el apropiado para realizar estudio de cariotipo con bandas R-replicas.

En este estadio, aún no se ha replicado el X inactivo de las hembras de mamíferos, por lo tanto, incorpora BrdU durante toda su replicación y por eso se muestra pálido cuando se colorea con Giemsa. Esta es la razón, por la que es fácil su visualización cuando se detecta a través de estas bandas.

Estadio II: corresponde a la población de células que estaba iniciando la fase S, cuando se adiciona el BrdU, por lo tanto, la mayoría de los cromosomas son levemente bandeados y su coloración con Giemsa muestra un patrón más pálido que de bandas oscuras frecuentes.

Estadio I: son las células que se encuentran en G_1 e inician su fase de duplicación en presencia del BrdU, por lo tanto, su patrón de coloración es completamente pálido, sin bandas.

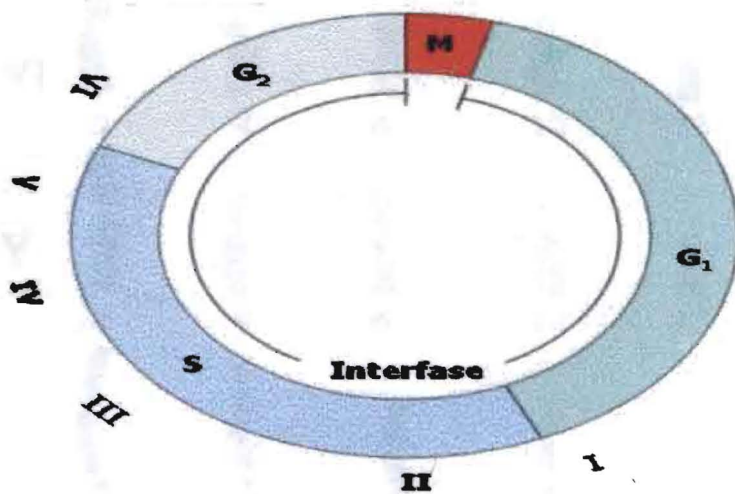


Figura 12. Esquema del ciclo celular que muestra la ubicación de cada uno de los estadios replicativos en linfocitos de sangre periférica en humanos. (Camargo y Ce0venka, 1981).

Mediante este procedimiento se puede determinar la cronología de la duplicación cromosómica del genoma de cualquier mamífero. Sin embargo, para poder llevar a cabo esta determinación, se requiere previamente mapear el tiempo de la fase y determinar cada uno de los estadios replicativos en esa especie.

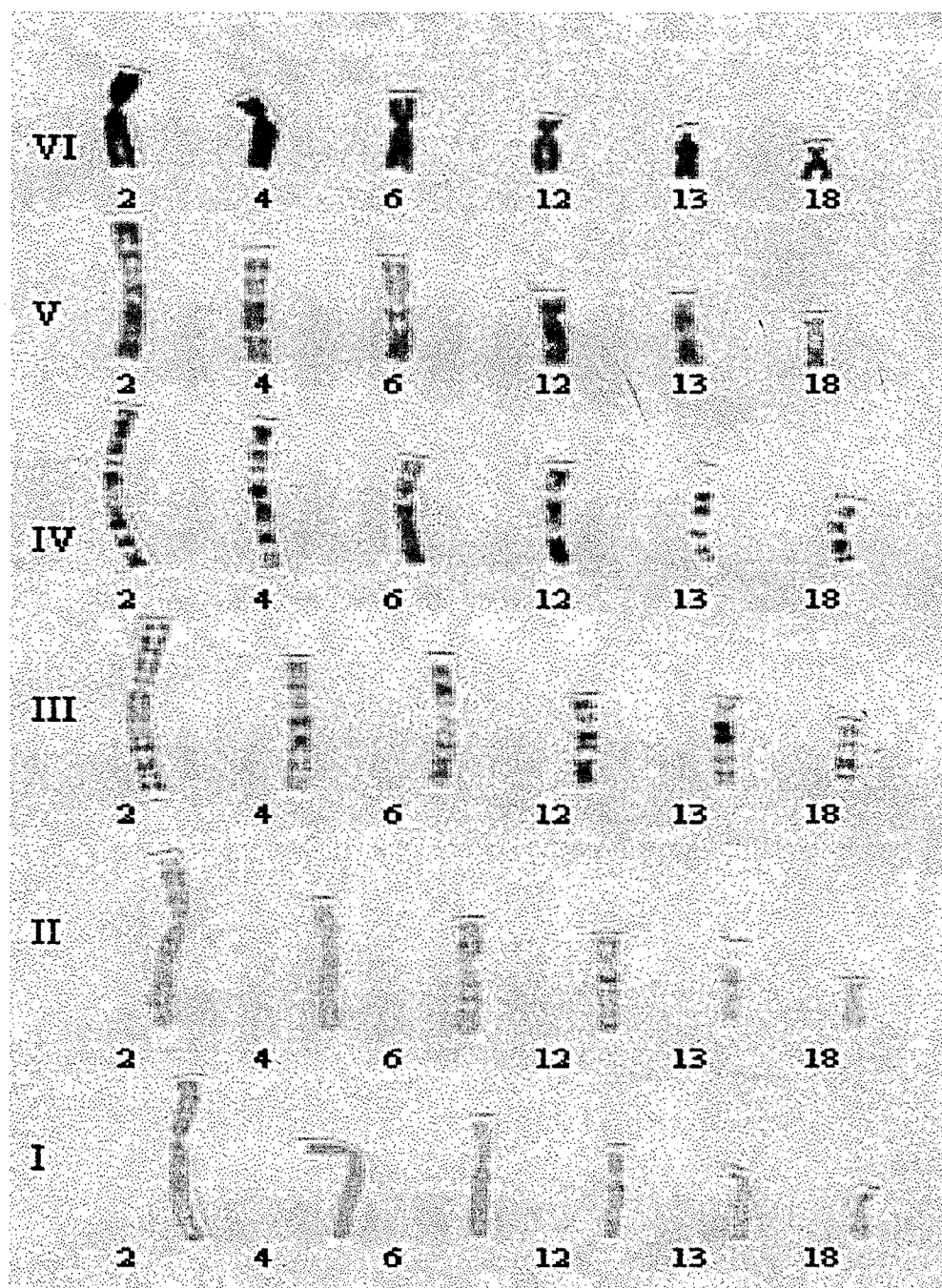


Figura 13. Estadios Replicativos de algunos cromosomas (2,4, 6,12, 13 y 18) del genoma humano de linfocitos de sangre periférica, utilizando pulso terminal de BrdU. (Laboratorio Citogenética la Sede).

En resumen, para determinar la cronología replicativa en el genoma de cualquier especie de mamífero se requiere estandarizar cada uno de los parámetros utilizados en los procedimientos citogenéticos de cultivo celular para la obtención de extendidos cromosómicos tales como: toma de la muestra, medio de cultivo, selección de la concentración del mitógeno, uso de hipotónica, pulso terminal de BrdU, tiempo de cultivo y concentración y tiempo de antimitótico.

Las bandas R-replicas basadas en los estadios replicativos, también son útiles para evaluar el efecto genotóxico de una droga o agente que bloquea o que cause daño en la estructura cromosómica en alguna fase específica del ciclo.

Además, tienen especial aplicación en la determinación del sexo cromosómico en especies de mamíferos. Por ejemplo, en organismos diploides como las hembras de mamíferos, se ha encontrado que poseen un cromosoma X activo el cual bandea similar a los autosomas y un cromosoma X inactivo que es de fácil visualización como se puede observar en la (Figura 15). También facilita la detección de anomalías estructurales cromosómicas que sean visibles al microscopio de luz.

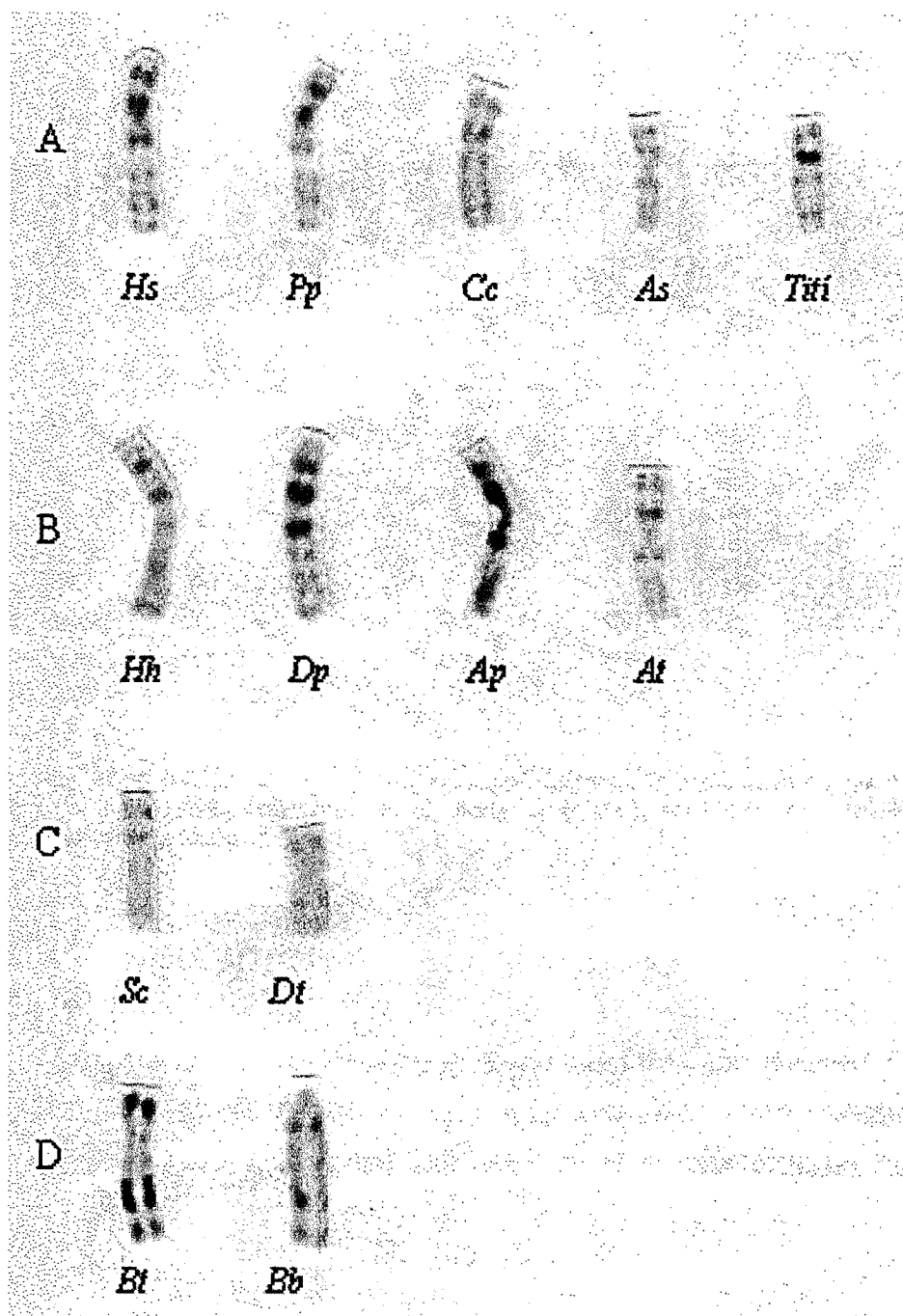


Figura 14. Cromosomas X en estadio III replicativo, de diferentes grupos de mamíferos: Grupo A: Hominidos como *Homo sapiens* (Hs)(humanos), *Pan paniscus* (Pp) (chimpancé), *Cebus capucinus* (Cc) (mico capuchino), *Alouatta seniculus* (As) (mono aullador) y *Saimiri sciureus boliviensis* (Titi). **Grupo B:** Hystricomorfos *Hydrochaeris hydrochaerous* (Hh) (chigüiro), *Dasyprocta punctata* (Dp)(ñeque), *Agouti paca* (Ap)(guagua de tierra caliente) y *Agouti taczanowskii* (At)(guagua de páramo). **Grupo C:** Cerdos *Sus scrofa* (Ss), *Tayassu tajacu* (Tt) (saíno) y el **Grupo D:** Rumiantes *Bos taurus* (Bt)(toro) y *Bubalus bubalis* (Bb) (búfalo de río). (Laboratorio Citogenética la Sede).

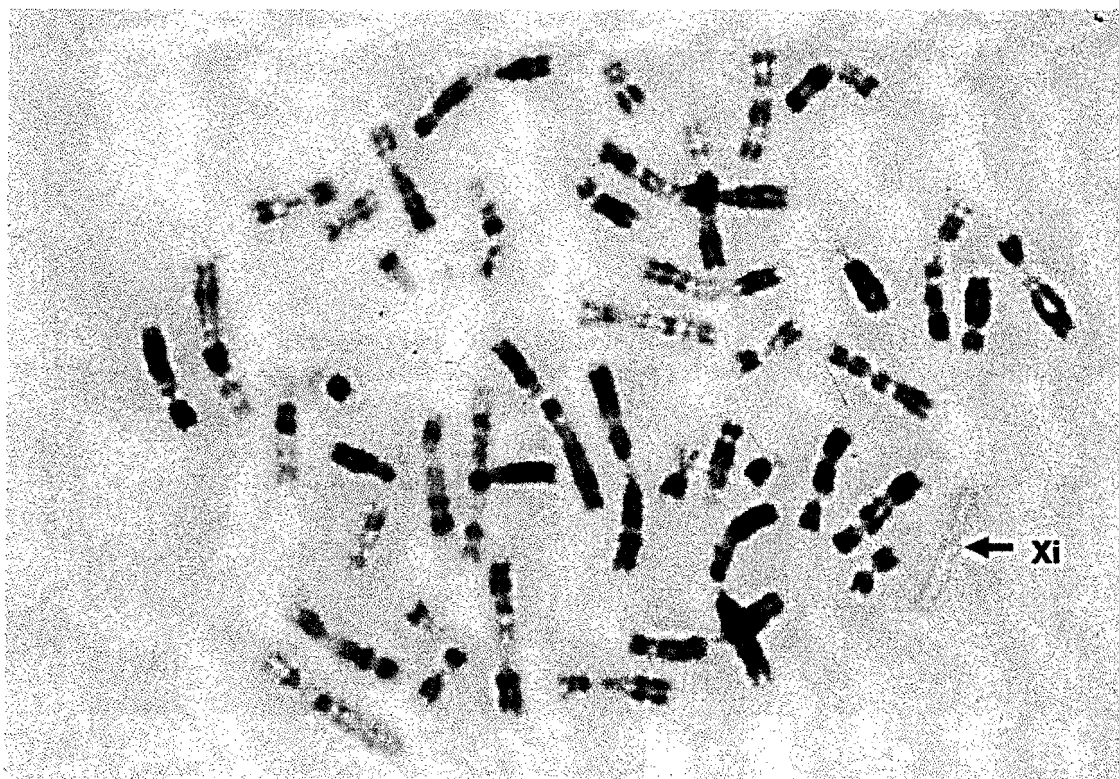


Figura 15. Cariotipo $2n=46XX$ humano con bandas R-replicativas a partir de linfocitos de sangre periférica. Sobresale el X inactivo (claro), marcado con la flecha. (Laboratorio Citogenética la Sede).

De igual modo, las bandas R-replicativas son útiles para evaluar el cromosoma Y y observar su grado de polimorfismo heterocromático entre individuos de la misma especie (Figura 16) o entre individuos de sexo masculino de distintas especies (Figura 17).



Figura 16. Diversos cromosomas Y humanos donde se muestra la asimetría lateral y diferentes patrones de polimorfismo, lo cual puede ser usado para estudios de paternidad. (Laboratorio Citogenética la Sede).

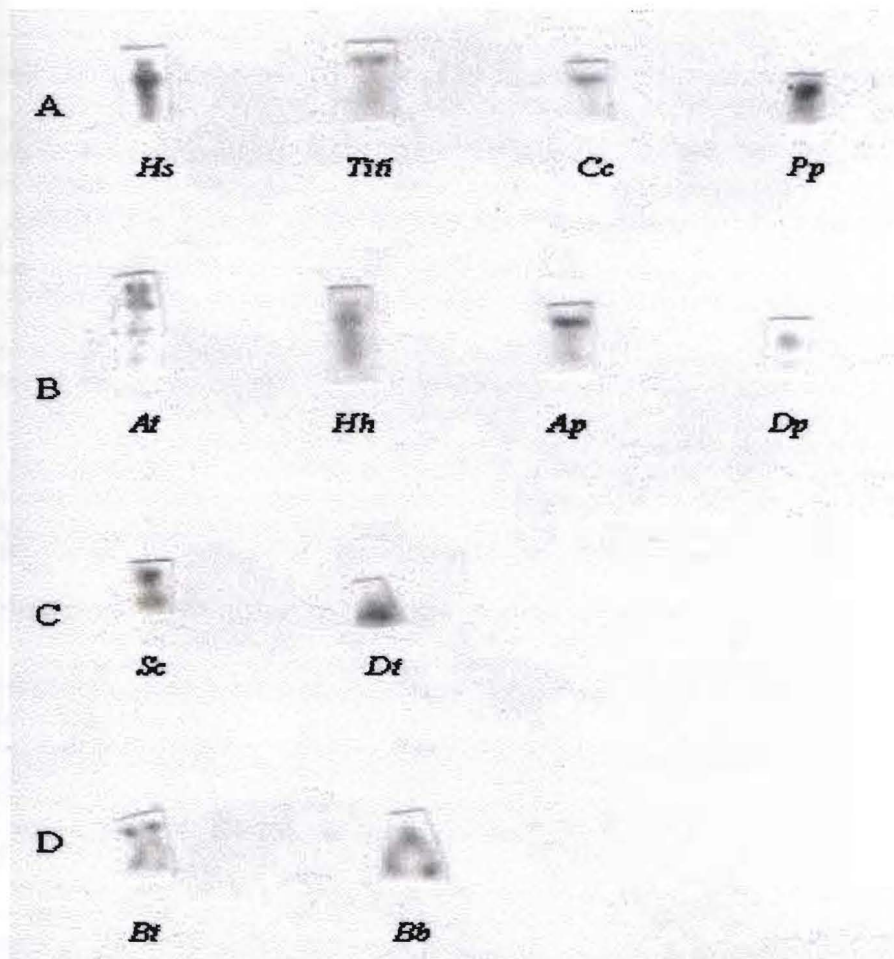


Figura 17. Cromosomas Y en estadio III replicativo, de diferentes grupos de mamíferos: Grupo A: Homínidos como *Homo sapiens* (Hs (hombre), y *Saimiri sciureus boliviensis* (titi), *Cebus capucinus* (Cc)(mico capuchino) y *Pan paniscus* (Pp)(chimpancé). Grupo B: Hysticomorfos *Agouti taczanowskii* (At), *Hidrochaeris hidrochaerous* (Hh) (chiguero), *Agouti paca* (Ap)(guagua de tierra caliente) y *Dasyprocta punctata* (Dp) (ñequé). Grupo C: Cerdos *Sus scrofa* (Ss (cerdo), *Tayassu tajacu* (Tt(saiño)) y el Grupo D: Rumiantes *Bos taurus* (Bt) (toro) y *Bubalus bubalis* (Bb).(búfalo) (Laboratorio Citogenética la Sede).

Ambos cromosomas sexuales X y Y se han utilizado en estudios de filogenia y para evaluar los orígenes paterno o materno de síndromes genéticos principalmente como diagnóstico citogenético en humanos (Figura 14 y 17).

31.1.7. Selección antimitótico y tiempo de exposición: colcemid vs colchicina.

El tiempo promedio para este bloqueo se ha encontrado entre $\frac{1}{2}$ y 1h para la obtención de extendidos metafásicos de buena calidad. Si se desea obtener extendidos más prometafásicos se debe bloquear sólo 20 min en presencia del antimitótico.

De un lado, el colcemid produce una estructura menos compacta y la colchicina produce efectos de compactación más rápida, por lo tanto, dependiendo de los objetivos del experimento, se puede seleccionar uno u otro compuesto. En algunos casos se pueden combinar el bromuro de etidio a concentraciones de 5ug/ml más el colcemid durante 1h para lograr extendidos prometafásicos de alta resolución combinado con alto número de mitosis.

El bromuro de Etidio por ser un agente intercalante del DNA, evita la compactación excesiva de los cromosomas en mitosis. Por esta razón, se pueden obtener cromosomas menos compactados con un tiempo largo de exposición al antimitótico.

3.2. PROCESAMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE EXTENDIDOS CROMOSÓMICOS.

Para realizar el procesamiento de los cultivos después de adicionado el colcemid o la colchicina, el cultivo se centrifuga, se descarta el sobrenadante y se le adiciona una solución hipotónica de citrato de sodio (0.7%) durante 10 min, si se trata de bovinos o de KCl (0.075M) durante 6 min, si se trata de humanos o roedores. La solución de citrato ofrece cromosomas con estructuras menos compactos pero mejora la resolución con la coloración, mientras la solución de KCl produce cromosomas más compactos.

Para fijar las muestras se utiliza fijador fresco preparado con metanol: ácido acético en proporción (3:1) mediante agitación fuerte y maniobrando rápidamente la muestra. En algunos casos se puede adicionar 1 ml de fijador a la hipotónica cuando se está iniciando el aprendizaje, sin embargo, los extendidos cromosómicos bajan de calidad en la estructura de los cromosomas.

El goteo de los extendidos cromosómicos se realiza limpiando el portaobjeto limpio utilizando preferiblemente etanol puro ya que el metanol puede resultar muy tóxico. Una vez goteadas las placas, se flamea cuidadosamente controlando la temperatura usando como indicador el dorso de la mano, luego se chequea al microscopio para evaluar el grado de dispersión de los cromosomas.

Se muestra en detalle el procedimiento usado en el Laboratorio de Genética de la Sede.

3.2.1. Protocolo de Obtención de Extendidos Cromosómicos a partir de una muestra de sangre periférica.

3.2.1.1. Procedimiento de cultivo

Nota: Todo el material utilizado debe haber sido previamente lavado con decol e isodine, enjuagado abundantemente con agua corriente y agua hirviendo y finalmente esterilizado.

En cada frasco de cultivo colocar:

8 ml de Medio RPMI 1640 completo (10% SBF)
100 ul de fitohemaglutinina
1ml de sangre (equivalentes a 8 gotas)
Incubar a 37°C durante 72 horas.

3.2.1.2. Procesamiento de los cultivos

- A cada cultivo, agregarle 100 ul de colchicina (0.04%) e incubar a 37°C durante 20, 30 ó 40 minutos (o el tiempo estipulado por el protocolo escogido de acuerdo al protocolo).
- Colocar el contenido de los frascos de cultivo en tubos cónicos de centrifuga (vidrio o plástico) marcados con el código correspondiente al cultivo y centrifugar a 2000 r.p.m. durante 10 minutos.
- Retirar con cuidado el sobrenadante usando pipeta de plástico preferiblemente, resuspender el botón de células y agregar 7 ml de KCL 0.075M o citrato de sodio al 0.7%. Mezclar muy bien con pipeta e incubar a 37°C durante 10 minutos.
- Centrifugar a 2000 r.p.m y descartar sobrenadante. Agregar vigorosamente 6 ml de fijador fresco (3 partes de metanol, 1 de ácido acético glacial) a cada tubo, mezclar e incubar durante 15 minutos a Temperatura ambiente.
- Centrifugar a 2000 r.p.m, retirar el sobrenadante, resuspender el botón y agregar nuevamente 10 ml de fijador fresco.

- Centrifugar a 2000 r.p.m, retirar el sobrenadante, adicionar una pequeña cantidad de fijador (1 ml o el volumen estandarizado una vez obtenido el primer extendido mitótico a través del goteo de placas).
- Goteo de extendidos mitóticos en placas limpias con etanol preferencialmente. En algunos casos, se puede utilizar el pregoteo de las placas utilizando el mismo fijador, luego se gotea la suspensión celular con la placa pregoteada.
- Finalmente para realizar goteo del botón celular, éste se resuspende en 0.3-0.5 ml de fijador fresco. Una fracción de esta suspensión se "gotea" a una altura de 45-50 cm sobre portaobjetos prelavados con etanol y sumergidos en agua helada. Las preparaciones se dejan escurrir de 20 a 30 segundos en posición ligeramente inclinada y luego se flamean levemente para incrementar la expansión cromosómica y reducir el trasfondo citoplasmático.
- La primera placa preparada de esta manera, se revisa al microscopio de contraste de fase, en el cual se evalúa el grado de dilución y de esparcimiento de los extendidos mitóticos. Por último, las placas se almacenan en cajas hasta el momento de ser coloreadas.

3.2.1.3. Coloración homogénea . Los extendidos se colorean con una solución de Giemsa al 5% durante 5 a 8 minutos. No se observan bandas ni características particulares de los cromosomas. Se usa para evaluación de índice mitótico, determinación del número cromosómico y tipo de cromosoma dependiendo de la ubicación del centrómero. Estas aplicaciones se describen en el aparte 4.1.1 de cariotipo sin bandas en el siguiente capítulo.

3.2.1.4. Coloración diferencial de bandas. Los protocolos de cada uno de los tipos de bandeos se describen en el capítulo 4, en cada una de las secciones donde se describen los tipos de bandas utilizadas en la elaboración de un cariotipo. Cada uno de los tipos de bandeo se seleccionan dependiendo del

objetivo del estudio. Por ejemplo, si se quiere caracterizar una especie, si se quiere utilizar como parámetro taxonómico, si se quiere evaluar rearrreglos cromosómicos o heteromorfismo a nivel individual o poblacional, entre otros.

3.2.2. Conservación de extendidos cromosómicos y búsqueda de las mitosis de interés.

Para almacenar los extendidos cromosómicos se pueden conservar cubriéndolas con resinas neutras tales como Entelan o Permout. El Entelan es ideal porque seca rápido y es menos costoso que el Permout, el cual puede demorar hasta 48h a 24°C de la temperatura ambiental. No es aconsejable utilizar el bálsamo de Canadá ya que en nuestro laboratorio ocasionalmente se ha presentado decoloración completa de la muestra, debido posiblemente a cambio extremo de pH.

Idealmente, los portaobjetos deben ser debidamente marcados utilizando un lápiz de diamante colocando la referencia del número del caso y del cultivo, y un orden secuencial que permitan almacenarlos adecuadamente. Se debe llevar un registro de cada una de las muestras almacenadas y de los lugares de almacenamiento, las cuales deben ubicarse en sitios alejados de polvo, luz y humedad.

Es conveniente realizar plantillas para la localización de los mejores extendidos o mitosis de interés lo cual facilita la localización posterior. Una plantilla sencilla

consiste en forrar un portaobjetos con cinta de enmascarar en la cual se ubica un punto visible a través del ocular del microscopio una vez se halla seleccionado una mitosis de interés. Otra forma fácil de ubicar la mitosis es utilizar las coordenadas del microscopio, sin embargo, se tiene el inconveniente que todos los microscopios no poseen el mismo sistema de coordenadas.

Para realizar el rastreo en 10X se comienza de derecha a izquierda o a la inversa pero siempre de extremo a extremo como se muestra en la Figura 18. En 40X se ubica la gota de los extendidos y se rastrea en un cuadrado imaginario como se muestra en la figura ya que los bordes de la gota generalmente tiene extendidos de mala calidad.

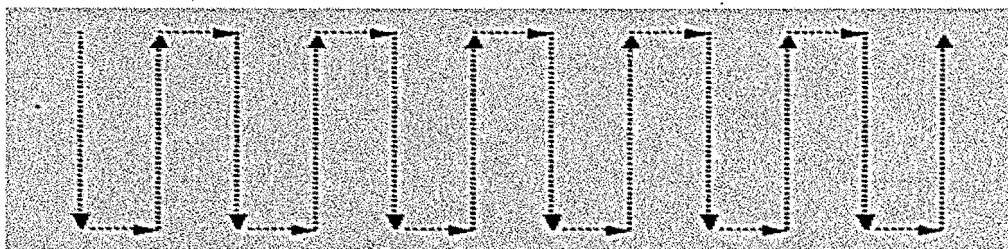


Figura 18. Esquema de la dirección de rastreo en el portaobjetos con objetivo 10X y 40X, para la búsqueda de extendidos cromosómicos analizables.

3.2.3. Proceso Fotográfico.

Para realizar la fotografía al microscopio de los extendidos cromosómicos de interés, se debe utilizar una película a blanco y negro de alto contraste tales como, Pantechanical 2415, Kodalith Ortho 6556 tipo 3 (Europa) y la Ortho Film 6556 tipo 3 (América), reveladas con D-19 durante 4 a 5 minutos.

El revelador D-19 puede ser adquirido comercialmente o preparado con la receta convencional (Anexo III). Para llevar a positivas se usa papel de mediano contraste como FORTE FPS-1, peso mediano, el FORTE-BNO, peso sencillo, el FORTE-FPN2, peso mediano y el Kodak Brome II RC N3, peso mediano. Todas estas referencias pueden ser reveladas con D-19 o D-72 (deftol) y fijadas con fijador universal.

Entre el proceso de revelado y fijación es recomendable usar agua acidulada (5% de ácido acético), lo cual evita el pronto amarillamiento del papel fotográfico.

Capítulo 4

4. MODELO EXPERIMENTAL PARA EL ANÁLISIS CROMOSOMICO II.

4.1. ELABORACIÓN DE UN CARIOTIPO.

4.1.1. CARIOTIPO SIN BANDAS

El cariotipo se define como el arreglo sistemático de los cromosomas ya sea a partir de un dibujo, una imagen, o una fotografía donde se supone que los cromosomas de una célula, tipifica tanto al individuo como a la especie. De otro lado, se denomina un *idiograma* a la representación diagramática de cada uno de los cromosomas del cariotipo con bandas o sin bandas.

Cuando se propone efectuar un cariotipo se pueden encontrar dos grandes categorías de organismos: aquellos que en mitosis compactan la cromatina en

forma de cromosomas metafásicos, visibles al microscopio de luz y los que no logran este tipo de estructura.

Para este último caso, el estudio del cariotipo se realiza utilizando electroforesis de campo pulsado la cual permite la separación de macromoléculas en bandas de diferente peso molecular las cuales se logran visualizar en un gel. Se tiene como inconveniente que no se puede determinar el grado de ploidía que posee el organismo, ni distingue entre dos cromosomas que posean similar número de pares de bases.

Para los organismos que compactan los cromosomas en mitosis, se usan los métodos establecidos por la citogenética clásica para la realización de un cariotipo, el cual se puede realizar a partir de cromosomas no bandeados (Figuras 16, 17 y 18) o usando métodos de bandeo apropiados para cada caso (Figuras 19, 20, 21 y 22).

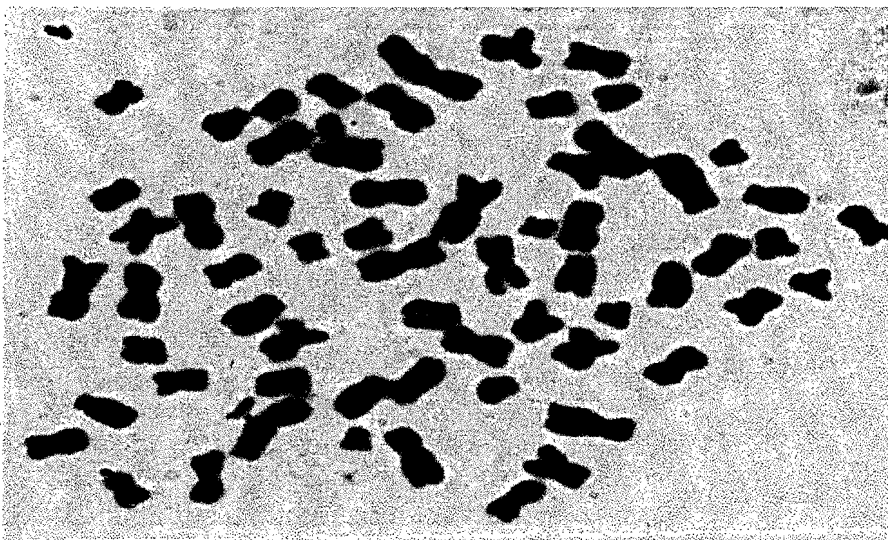


Figura 19. Cariotipo de *Dasyprocta* sp. (ñeque o guatín) $2n=66XX$ con tinción homogénea obtenidas de linfocitos de sangre periférica. (Laboratorio Citogenética la Sede).

Cuando se desea elaborar un cariotipo con cromosomas no bandeados se siguen los siguientes pasos:

4.1.1.1. Conteo de Cromosomas. En una muestra que se va a analizar, se determina el número cromosómico del organismo en un número representativo de 50 mitosis, que permitiría descartar la posible variación en el número cromosómico por pérdida de cromosomas debido a problemas técnicos y se descartan las posibles asociaciones entre cromosomas acrocéntricos observados frecuentemente entre ellos.

Para determinar el número cromosómico de una especie, se requiere además, evaluar un número representativo de individuos de ambos sexos de esa especie, para descartar posibles variaciones dentro de organismos considerados de la misma especie o detectar posibles polimorfismos poblacionales. El número de organismos a analizar depende de la disponibilidad de individuos para el estudio, aún cuando idealmente se recomienda un tamaño muestral siguiendo los criterios estadísticos o dependiendo de los objetivos trazados en la investigación.

Luego de realizar el conteo de los cromosomas, se procede a la localización del centrómero, lo cual nos permite determinar los dos brazos que posee un cromosoma: *p* o brazo corto y *q* o brazo largo. De la relación obtenida entre los brazos de los cromosomas se pueden clasificar como metacéntrico, submetacéntrico, acrocéntrico o subtelocéntrico. Para esta clasificación, es necesario determinar los índices centromérico y braquial (Tabla 7).

4.1.1.2. Cálculo de Índice Centromérico (IC): se obtiene relacionando el brazo corto con la longitud total del cromosoma y se expresa en porcentaje de acuerdo a la siguiente relación:

$$IC = \frac{L_p}{L_T} \times 100$$

L_p = Longitud del brazo p; L_T = Longitud total del cromosoma

4.1.1.3. Cálculo del Índice Braquial (IB). Relaciona la longitud de los dos brazos p y q y se expresa en porcentaje:

$$IB = \frac{L_q}{L_p} \times 100$$

L_q = Longitud del brazo q; L_p = Longitud del brazo p

Tabla 7. Clasificación de cromosomas por ubicación del centrómero.

INDICE CENTROMERICO	INDICE BRAQUIAL	CLASIFICACION
46-50	100	Metacéntrico
26-46	33-88	Submetacéntrico
15-25	6-33	Acrocéntrico
<15	<5%	Subtelocéntrico

La clasificación de los cromosomas relacionados con su tamaño, permite establecer semejanzas que conllevan a la identificación de cromosomas homólogos. Una vez clasificados los cromosomas y agrupados en pares homólogos, se podría sospechar sobre los cromosomas determinantes del sexo en el macho de mamíferos.

4.1.1.4 Cálculo de la Longitud Relativa (Lr): Para proponer el cariotipo, es necesario establecer un orden dentro de los cromosomas, lo cual se logra, calculando la longitud relativa de cada par homólogo, expresado en porcentaje, lo cual se obtiene de dividir el tamaño del cromosoma entre la longitud total del grupo haploide femenino.

Los cromosomas numerados pueden ser organizados en grupos, por parámetros establecidos por el investigador siguiendo los lineamientos de la nomenclatura internacional para cromosomas humanos o animales. Por ejemplo, si dos cromosomas del mismo grupo, tienen igual **Lr**, irá primero el que mayor **IC** o **IB** posea.

$$Lr = \frac{Lc}{\sum \text{grupo haploide de cromosomas}} \times 100$$

Lc= longitud de cada cromosoma

Los cromosomas sexuales en el cariotipo pueden localizarse aparte o ubicarlos en un sitio determinado por la longitud relativa. El siguiente es un ejemplo de la manera como se constituye un cariotipo sin bandas en humanos (Figuras 20 y 21).



Figura 20 . Cariotipo humano 46XY, coloración homogénea convencional con Giemsa. (Laboratorio Citogenética la Sede).

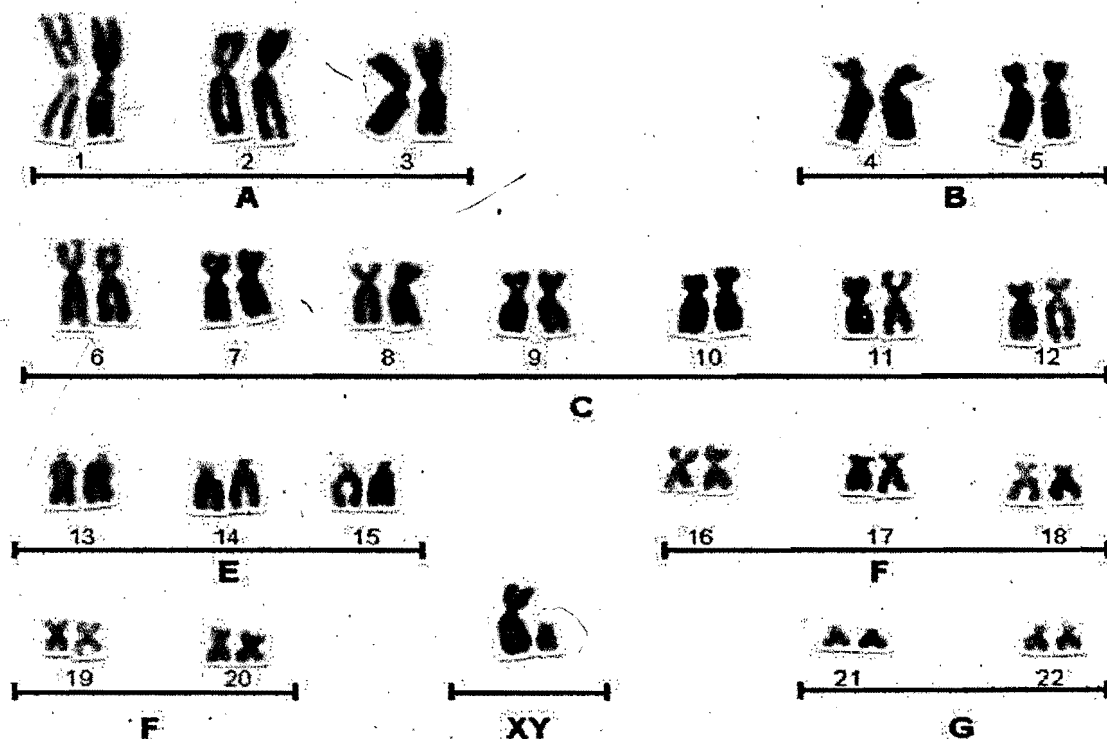


Figura 21. Cariotipo de cromosomas humanos 46XY con coloración homogénea organizados según las normas ISCN donde se establecen la organización de los cromosomas en grupos (A, B, C, D, E, F, G y los sexuales), según su tamaño y la posición del centrómero. (Laboratorio Citogenética la Sede).

4.1.2. CARIOTIPO CON BANDAS

La citogenética moderna ha implementado diversas técnicas que producen patrones de bandas sobre la estructura del cromosoma metafásico. En el capítulo 3, en pulso terminal de BrdU se describió brevemente para bandas R-replicativas.

Las técnicas que generan bandas, se pueden clasificar en dos grupos:

4.1.2.1. Bando Cromosómico en toda la longitud del cromosoma. Las Figuras 13, 14 y 15, muestran unos ejemplos de este tipo de bando. Los métodos citogenéticos que generan este tipo de bandas, permiten realizar técnicas para los bandeos G, Q, R y R-replicativos .

Por ejemplo las bandas G oscuras comprenden regiones genéticamente inactivas, ricas en pares A=T (Figura 30), las bandas Q fluorescentes y las bandas R oscuras corresponden a regiones genéticamente activas ricas en G=C y las bandas R-replicativas pálidas corresponden a regiones ricas en A=T genéticamente inactivas y a toda la porción del genoma que por regulación en la expresión génica se encuentran inactivas. En otras palabras, muestra con más exactitud la funcionalidad del genoma. Uno de los casos más sobresalientes es el caso del cromosoma X inactivo de la hembra de mamíferos que se visualiza totalmente pálido (Figura 22).

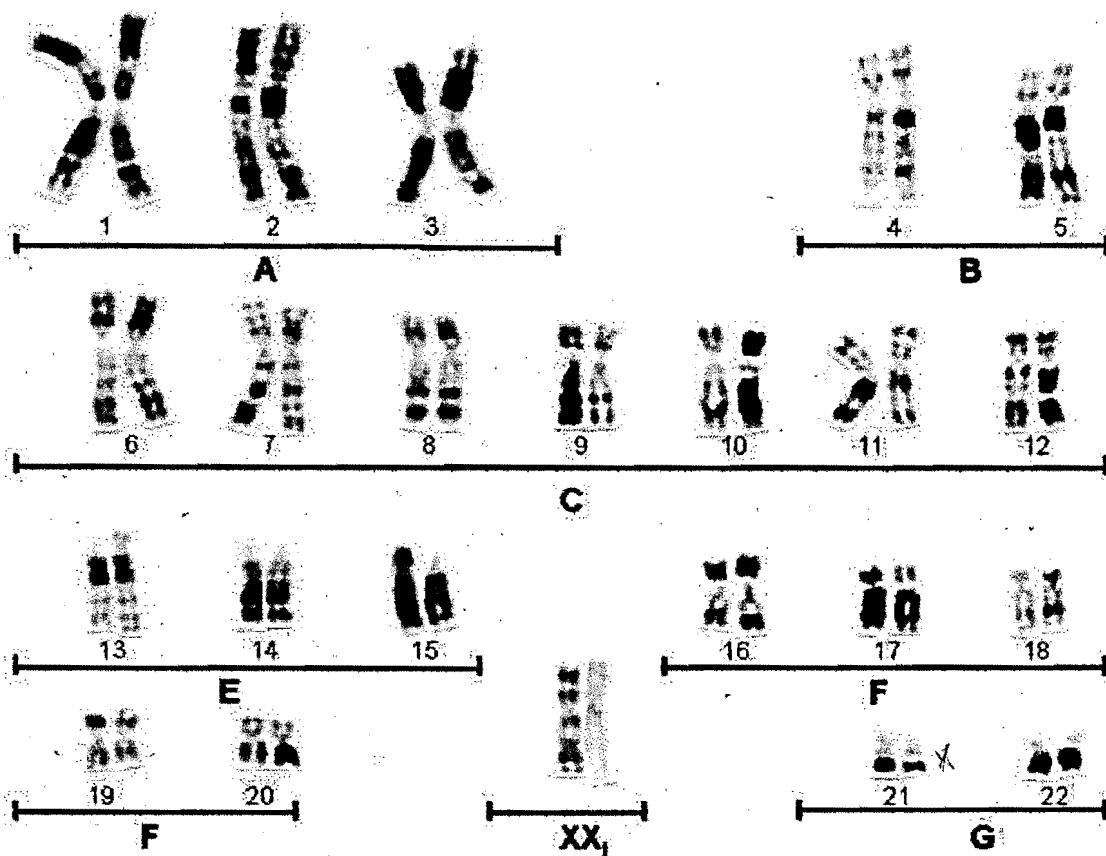


Figura 22. Cariotipo humano 46XX con bandas R-replicas organizado según las normas ISCN donde se establecen la organización de los cromosomas en grupos A, B, C, D, E, F y G los sexuales, donde se pueden reconocer los pares homólogos según su patrón de bandas. (Laboratorio Citogenética la Sede).

En general, todas las bandas de este tipo, son útiles en el reconocimiento de cromosomas homólogos, por lo tanto, permite organizar cariotipos por pares cromosómicos (Figura 22) con más exactitud que si se realiza con sólo coloración homogénea (Figura 20 y 21).

4.1.2.1.1. Bandas R-replicativas. El principio usado para bandas R-replicativas de alta resolución mediante pulso terminal de BrdU, se basa en el método establecido por Camargo y Cervenka (1981) para evaluar la cronología en la replicación de cromosomas humanos, con las modificaciones estandarizadas en el Laboratorio de Citogenética de la Sede.

Este método permite clasificar la fase S del ciclo celular en períodos I, II, III, IV, V y VI, como se describió en el numeral 3.3.1.6. y se representa en la Figura 13. El estadio III del cariotipo de una especie, revela un patrón de bandas cromosómicas altamente similares a las bandas G reversas de esta especie. Esto nos permite establecer las bandas R- replicativas de alta resolución, dependiendo del grado de compactación de los cromosomas (Figura 11).

4.1.2.1.2. Protocolo para Bandas R-replicativas. Para la coloración de bandas R-replicativas el proceso de maduración de los extendidos puede ser de 1 a 30 días y el tiempo de exposición a la solución Giemsa al 4% es de 2-5 min dependiendo del protocolo de hipotónica utilizado y de la calidad del goteo.

La solución de trabajo de Giemsa se puede preparar a partir de la solución madre de Giemsa diluida en agua destilada, lo cual ha mostrado, en nuestra experiencia igual resultado en el proceso de coloración, que si la solución de trabajo se prepara en el buffer Sorensen usado en los protocolos citogenéticos convencionales.

El siguiente es el protocolo usado en el Laboratorio de la Sede:
y Cervinka, modificado por López et al, 1997)

(Camargo

- Se toman láminas entre 0-30 días después de "goteadas" y se sumergen en solución bis BENZIDIMIDE (Hoechst 33258) 0.3µg/ml durante 10 minutos.
- Se lavan con agua destilada en dos pasos sucesivos y se secan suavemente, hasta remover el agua. A cada lámina en posición horizontal, se le agregan 0.3 ml de solución 2×SSC y se cubre con una laminilla de 22×60 minutos.
- Cada lámina, se expone a iluminación con una lámpara *Sylvania capsylite* 75w, 120w PAR 30, a 60°C, durante 40 minutos. Se remueve la laminilla, de tal forma que no haya deslizamiento.
- Cada laminilla se lava con agua destilada y se seca, agitando suavemente al aire.
- Luego, se le agrega la solución de Giemsa diluida al 5% en agua corriente, durante 2 minutos.
- Por último, la preparación permanente se realiza cubriendo la muestra con *Permout*, protegido con una laminilla.
- Las láminas que contienen extendidos cromosómicos, que no fueron expuestas a pulso terminal de BrdU, se tiñen directamente con Giemsa diluida al 5% en agua corriente, durante 5 minutos.

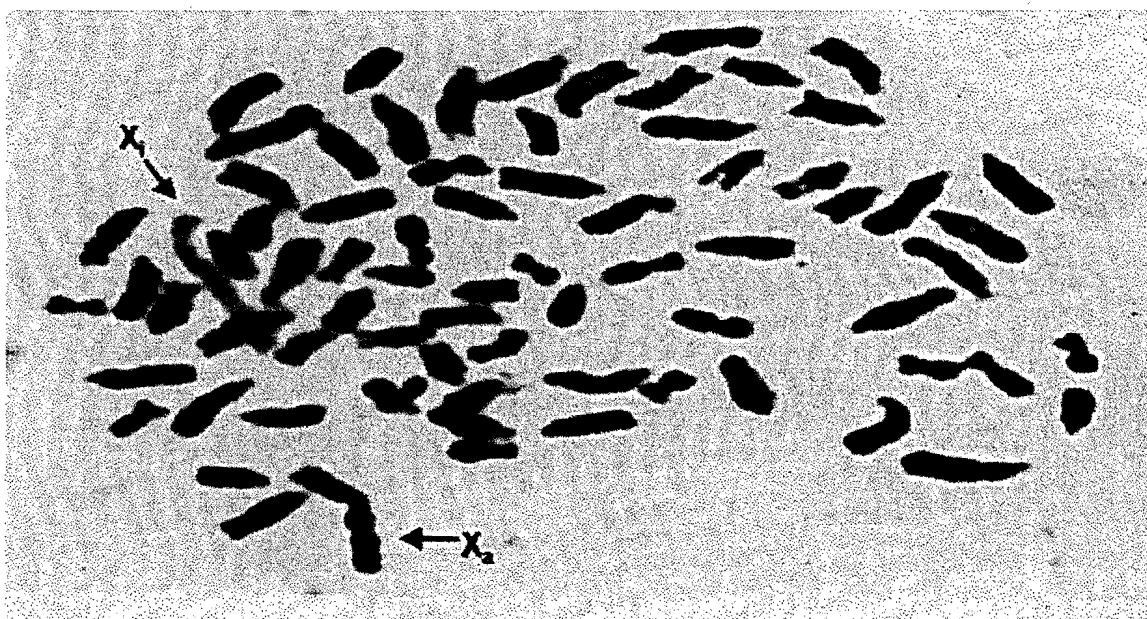


Figura 23. Cariotipo $2n=74XX$ de *Agouti paca* (guagua de tierra caliente) con bandeo R-replicativo obtenido a partir de linfocitos de sangre periférica. Las dos flechas señalan las dos cromosomas X: X activo (X_a) y X inactivo (X_i). (Laboratorio Citogenética la Sede)



Figura 24. Cariotipo $2n=50XY$ de *Bubalus bubalis* (búfalo de río) con bandeo R-replicativo obtenidos a partir de linfocitos de sangre periférica. La flecha señala los cromosomas X y Y. (Laboratorio Citogenética la Sede).

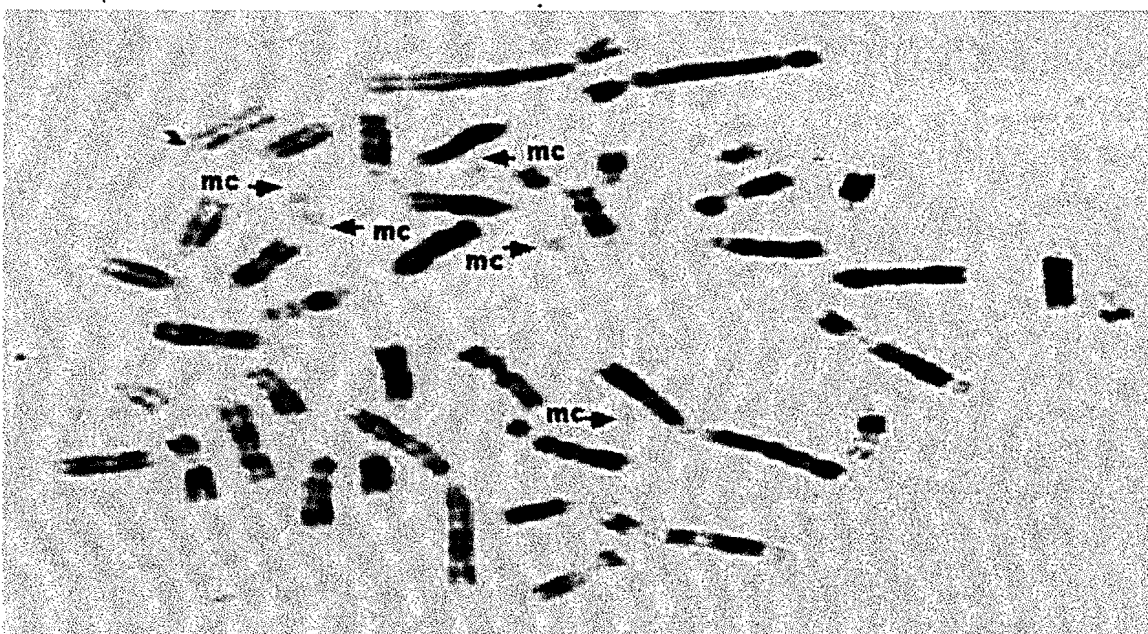


Figura 25. Cariotipo de un macho $2n=45$ de *Alouatta seniculus* (mono aullador) con bandeo R-replicativo obtenido a partir de linfocitos de sangre periférica. La flecha señala los minicromosomas (mc) y sólo el cromosoma sexual X ya que en esta especie no se ha identificado el cromosoma Y (Laboratorio Citogenética la Sede).

Con la presencia de estas bandas se pueden comparar los cromosomas y con ello se puede identificar con exactitud los pares homólogos. Dado que cada cromosoma exhibe un patrón de bandas específicas, con estas técnicas se pueden detectar aberraciones cromosómicas tales como translocaciones (Figura 29) duplicaciones, inversiones, aneuploidías (Figura 26), entre otras. Otra utilidad que pueden tener estas bandas es la relación que puede inferirse respecto a la estructura de la cromatina que constituye un genoma (Figuras 27 y 28). Además se puede realizar filogenia cromosómica en grupos de organismos taxonómicamente relacionados como es el caso de los trabajos realizados en primates.

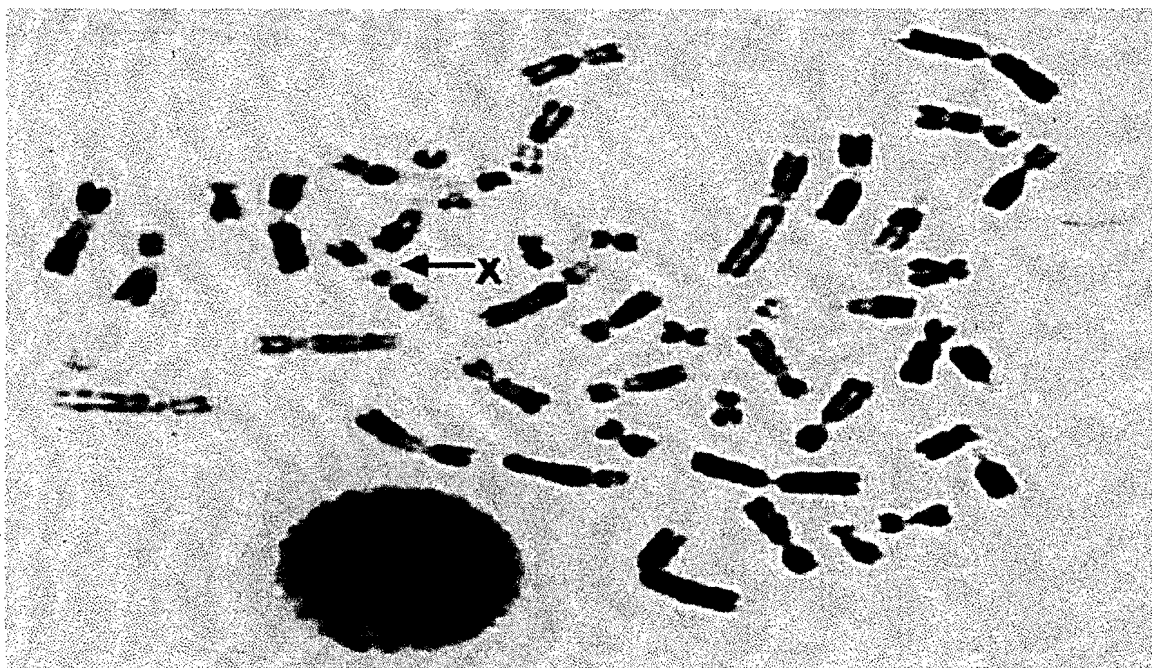


Figura 26. Aneuploidía sexual humana. Síndrome de Turner. Cariotipo $2n=45X$ con bandas R-replicas obtenidas de linfocitos de sangre periférica. La flecha muestra el cromosoma sexual X. (Laboratorio Citogenética la Sede).

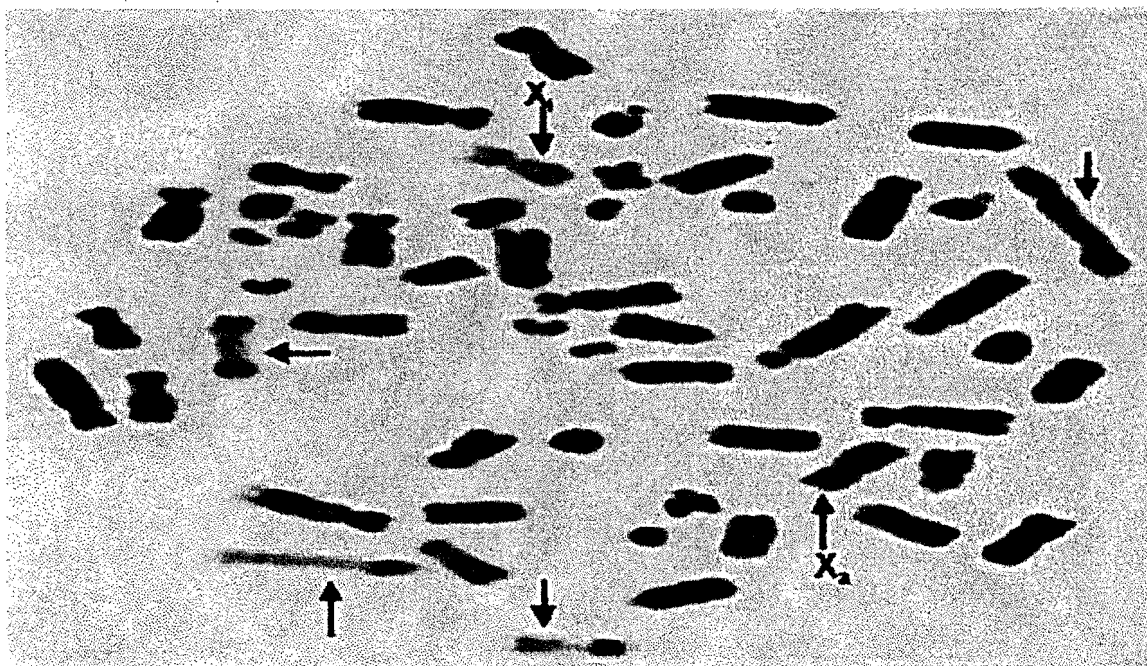


Figura 27. Heteromorfismo cromosómico en cariotipo $2n=46XX$ de *Cebus capucinus* con bandeo R-replicativo . La flecha señala los cromosomas que muestran heteromorfismo heterocromático. (Laboratorio Citogenética la Sede).

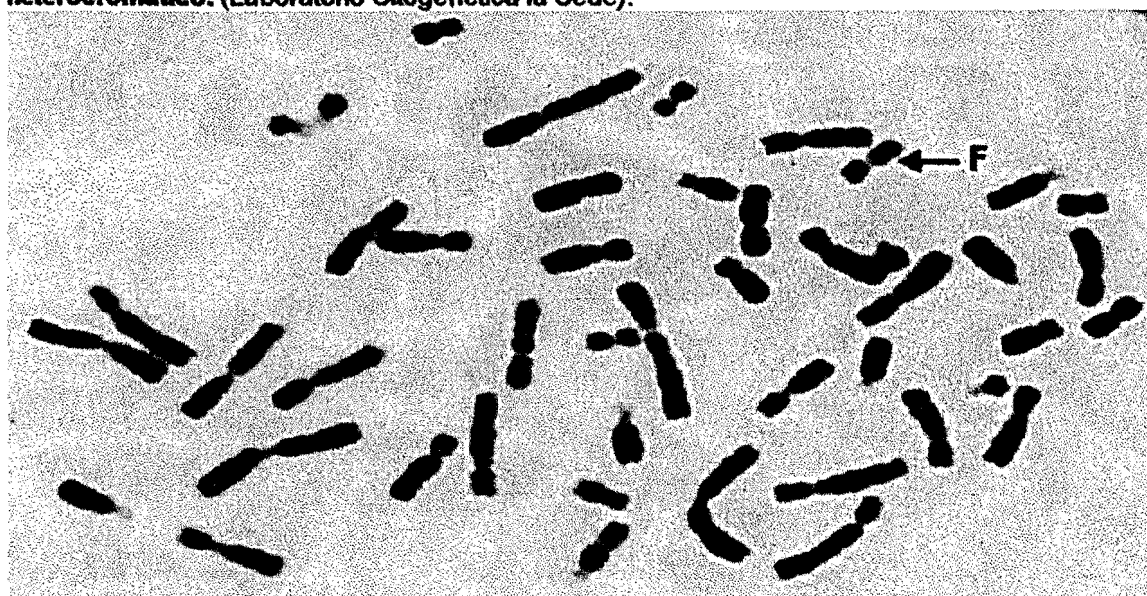


Figura 28. Fragilidad en el cromosoma 16 de un cariotipo humano $2n=46XX$ con bandas R-replicas obtenidas de linfocitos de sangre periférica. La flecha señala el sitio frágil. (Laboratorio Citogenética la Sede).

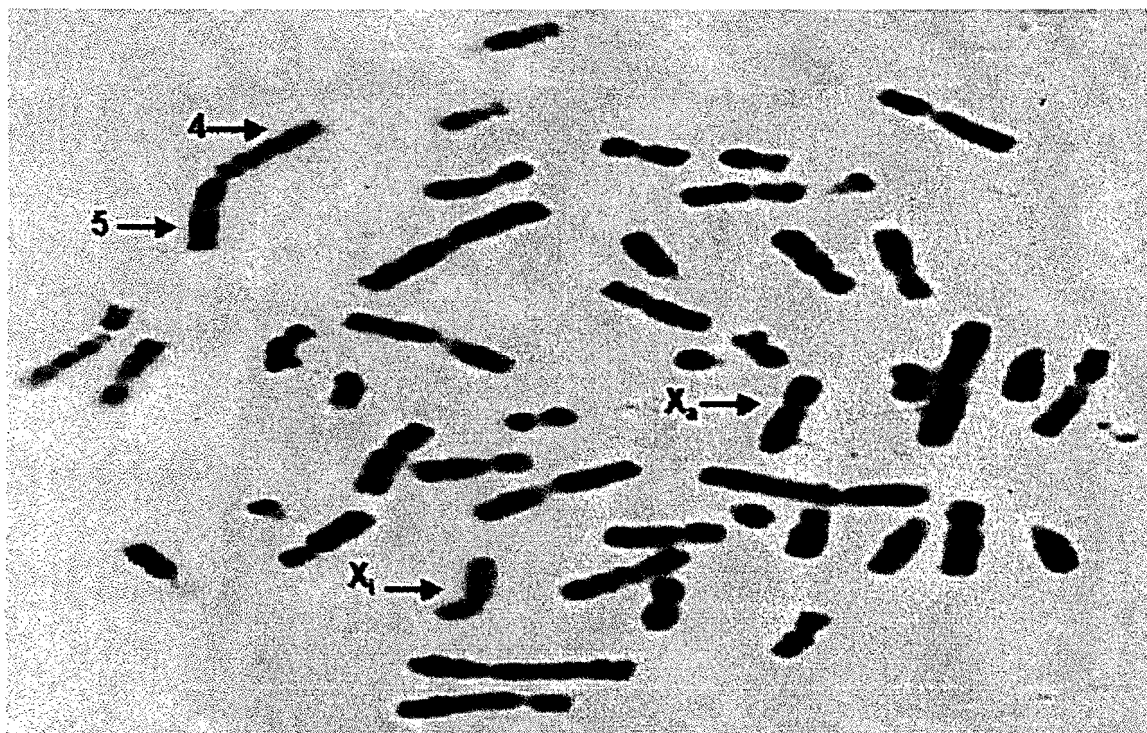


Figura 29. Translocación cromosómica no Robertsoniana en cromosomas 4-5 de un cariotipo humano $2n=46XX$ con bandas R-replicas obtenidos de linfocitos de sangre periférica. La flecha señala la translocación. (Cortesía Laboratorio INGEIN Clínica Las Vegas).

4.1.2.1.3. Bandas G. Este patrón de bandas se considera reverso al R-replicativo y al Q. Su principal aplicación es la identificación de homólogos y tipo de cromatina. Es muy utilizado en diagnóstico clínico a nivel humano y en caracterizaciones de especies animales en diferentes laboratorios en todo el mundo, a pesar de que no es tan fácil conservar la reproducibilidad de la técnica.

Hay diversos protocolos para la realización de estas bandas, pero el más usado es el que utiliza tripsina como tratamiento degradativo diferencial de la estructura cromosómica.

4.1.2.1. 4. **Protocolo para BANDAS G.** (Seabright modificada 1971; Howell and Black, 1978)

- Utilizar láminas con extendidos envejecidos por lo menos de 3 a 4 días, o exponerlas a 65°C inmediatamente se goteen .
- En un frasco Copling colocar una solución de tripsina al 0.05%, disuelta en solución salina (0.86%) durante 30 segundos y 1 minuto. El tiempo de exposición de las placas goteadas en la solución de tripsina fluctúa entre 30 y 40 segundos dependiendo de las condiciones del laboratorio. Dependiendo del tiempo de envejecimiento de la placa, el tiempo de exposición a la tripsina aumenta.
- Estandarizar el tiempo de exposición a la tripsina antes de someter todos los extendidos cromosómicos a la misma solución. Detener la acción de la tripsina, enjuagando con solución salina.
- Colorear durante 2-4 minutos con solución de trabajo Giemsa al 4% diluido en buffer fosfato pH 6.8 o en agua destilada.
- Secar con flameo suave.

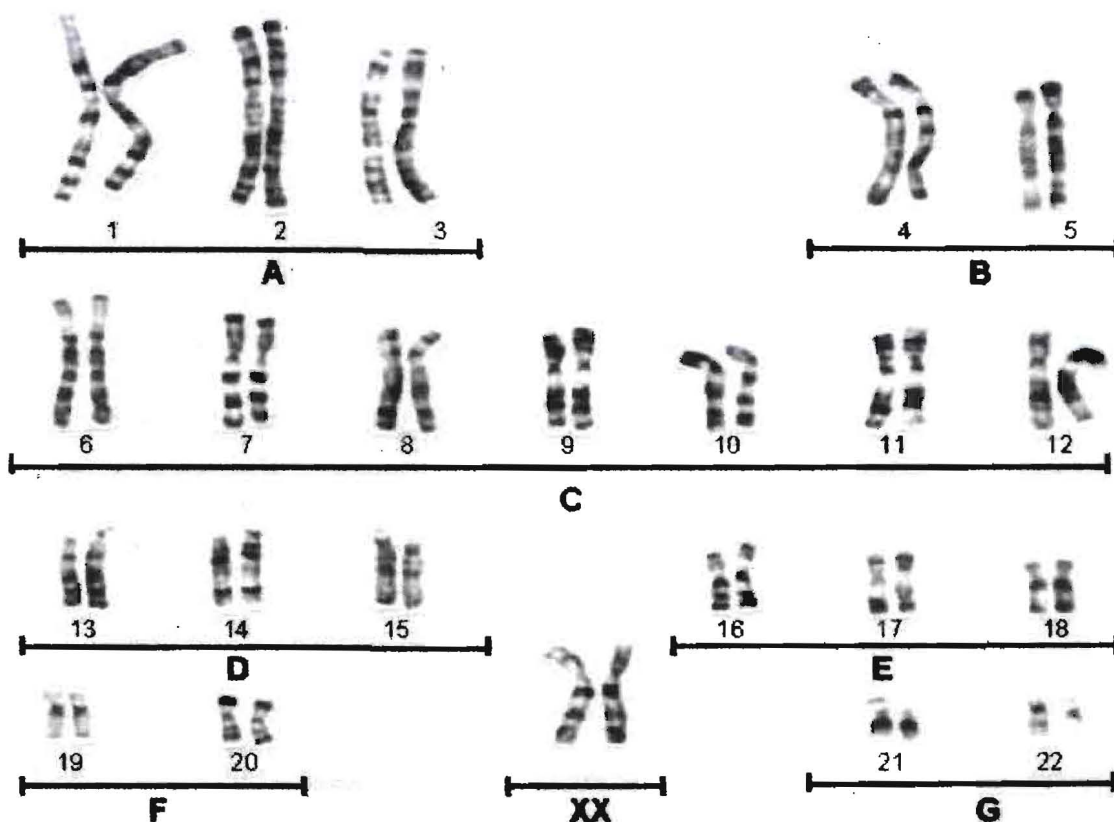


Figura 30. Cariotipo humano 46XX con bandas G-tripsina. Se muestran los pares homólogos organizados en grupos A, B, C, D, E, F, G y el par sexual de acuerdo a la norma ISCN (Laboratorio Citogenética la Sede)

4.1.2.1.5. Bandas Q. Es reverso al G y se realiza utilizando un fluorocromo como la quinacrina de donde deriva su nombre. Fue uno de los primeros bandeos utilizados, sin embargo, ha entrado en desuso debido a lo costoso del fluorocromo y al requerimiento de microscopio de fluorescencia y su carácter efímero.

4.1.2.1.6. Protocolo de Bandas Q. (Sumner and Evans, 1973)

- Prender la lámpara de fluorescencia por 30 minutos.
- Adicionar quinacrina al 0.5% sobre la lámina por 30 minutos a temperatura ambiente.
- Lavar con agua destilada y secar al ambiente.
- Colocar sobre la lámina 2 ó 3 gotas de buffer fosfato pH 6.8 ó buffer de fluorescencia y luego cubrir con laminilla, secar el sobrante del buffer.
- Observar al microscopio el menor tiempo posible ya que la fluorescencia decae rápidamente.

Es muy frecuente encontrar fotografías de cariotipos con este tipo de bandas en textos corrientes y en artículos de revistas.

4.1.2.2. Bando en Sitios Específicos de la Estructura Cromosómica. El segundo grupo de bandas contempla todas aquellas que se inducen en números restringidos y se localizan en sitios específicos de la estructura del cromosoma. A este tipo de bandas pertenecen las C,T, C_d, G₁₁ y RON (regiones organizadoras

del nucleólo). Cada una de ellas con una utilidad específica, las cuales se describen brevemente a continuación.

4.1.2.2.1. Bandas C. Detecta heterocromatina constitutiva y se localizan preferencialmente en las regiones centroméricas y ocasionalmente en otras regiones del cromosoma (Figura 23 y 24). Por su capacidad para detectar heterocromatina constitutiva tiene gran importancia en la evaluación de polimorfismos y para detectar rearrreglos estructurales en regiones centroméricas, cromosomas dicéntricos e isodicéntricos.

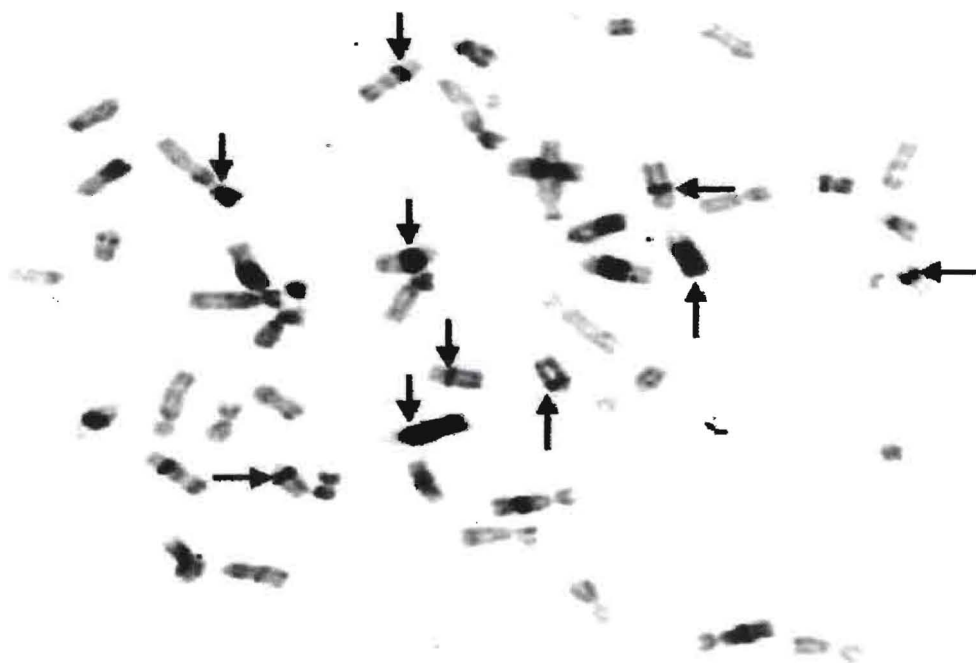


Figura 31. Bandas C del cariotipo $2n=54$ XY de *Cebus capuccino* (mico capuchino)
(Laboratorio Citogenética, la Sede)

4.1.2.2.2. Protocolo para Bandas C. (Sumner, 1972; Arrighi y Hsu, 1971)

Con este procedimiento se tiñen intensamente los centrómeros, las constricciones secundarias de los cromosomas 1,9,16 y la porción distal del brazo largo del cromosoma Y en humanos. En otras especies de mamífero, varía en cada una de las especies estudiadas. Con este tipo de bandeado se localiza la heterocromatina constitutiva.

- Utilizar láminas de mínimo 4 días de envejecimiento a temperatura ambiente.
- Tratar las láminas con HCl 0.2 N, a temperatura ambiente durante 40 minutos.
- Lavar con agua destilada.
- Tratar las láminas con una solución de hidróxido de bario $\text{Ba}(\text{OH})_2$ al 5% previamente filtrada calentando a 53°C por 4-6 minutos para aumentar la solubilidad del hidróxido de bario. A mayor calentamiento se dañan los cromosomas.
- Lavar rápidamente para evitar precipitación y secar.
- Colocar las láminas en $2\times\text{SSC}$ a 55°C por 60 minutos.
- Lavar con agua destilada y secar.
- Tefir con solución de trabajo de Giemsa al 4%, durante 2 a 4 minutos.
- Lavar y secar con flameo suave.

Nota: Una vez teñida la placa, si los cromosomas aparecen muy pálidos, el tiempo de exposición a $\text{Ba}(\text{OH})_2$ debe disminuirse. Cuando los cromosomas están hinchados pero las bandas se observan bien, debe disminuirse la temperatura de la solución $2\times\text{SSC}$.

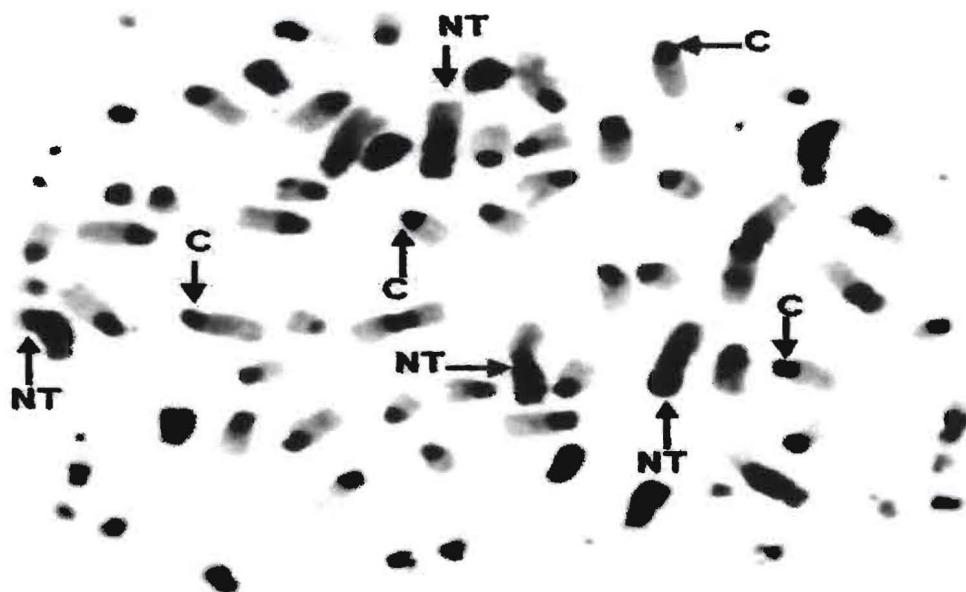


Figura 32. Bandas C en cromosomas de *Agouti* sp. (guagua de páramo) $2n = 70$. Se observan cromosomas y brazos completamente positivos . (Cortesía Luz Adriana Ramírez Arias, Trabajo de Grado).

4.1.2.2.3. Bandas G-C. Diferencian regiones de heterocromatina constitutiva ricas en C=G de las de A=T. Se utiliza como criterio de clasificación en estudios de filogenia de especies.

4.1.2.2.4. Protocolo Bandas G-C. (Montserrat, P. 2000)

- Una placa recién goteada se le agrega solución de Leishman con el tampón Leishman a una proporción 1:4.
- Colocar la solución de Leishman en el portaobjetos y dejar actuar durante 5 minutos. Lavar con agua destilada y dejar secar.
- Observar al microscopio.

4.1.2.2.5. Bandas G₁₁. Diferencian regiones heterocromáticas localizadas tanto a nivel centromérico como intercalar y sirve para determinar polimorfismo. Este hecho ha planteado la posibilidad de ser usado como prueba para determinar la paternidad. Otra posible utilidad es la de establecer origen de cromosomas marcadores.

4.1.2.2.6. Bandas T. Las bandas T derivan su nombre debido a que tiñe regiones correspondientes al telómero por lo tanto son útiles para determinar la presencia o no de telómeros en aberraciones cromosómicas relacionadas con deleciones terminales o cromosomas en anillo. Además puede servir para detectar regiones teloméricas intersticiales que aunque en este momento no se sabe con certeza su papel dentro del genoma, podrían significar cicatrices evolutivos que han dejado los rearrreglos estructurales en su transcurrir filogenético.

4.1.2.2.7. Bandas C_d. Con esta técnica de bandeo se pueden determinar regiones donde se localizan centrómeros ya sean activos o inactivos. Estas bandas tienen su principal aplicación en el estudio filogenético de los cromosomas principalmente cuando éstos se derivan de una translocación Robertsoniana donde se han conservado los dos centrómeros, pero sólo uno de ellos permanece activo. Un ejemplo de éstos es el cromosoma 2 de la especie humana, el cual se originó por la fusión de dos cromosomas que conservan sus dos brazos cortos, por lo tanto, permanecen los dos centrómeros siendo uno de ellos inactivo (Figura 33).

Otra utilidad que tienen las bandas Cd es determinar si en una translocación Robertsoniana existe la pérdida de uno de los centrómeros (Figura 34).

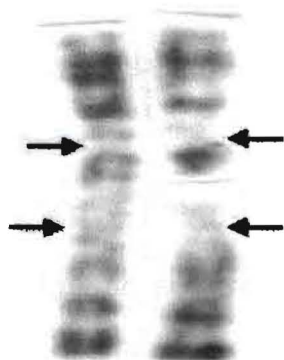


Figura 33. Modelo de formación del cromosoma 2 humano (izquierda) por la fusión de los brazos cortos de los cromosomas 12 y 13 de *Pan paniscus* (chimpancé) (derecha) usando bandas Cd. Las flechas señalan en cada caso los sitios de ubicación de cada uno de los centrómeros en cada cromosoma de cada especie

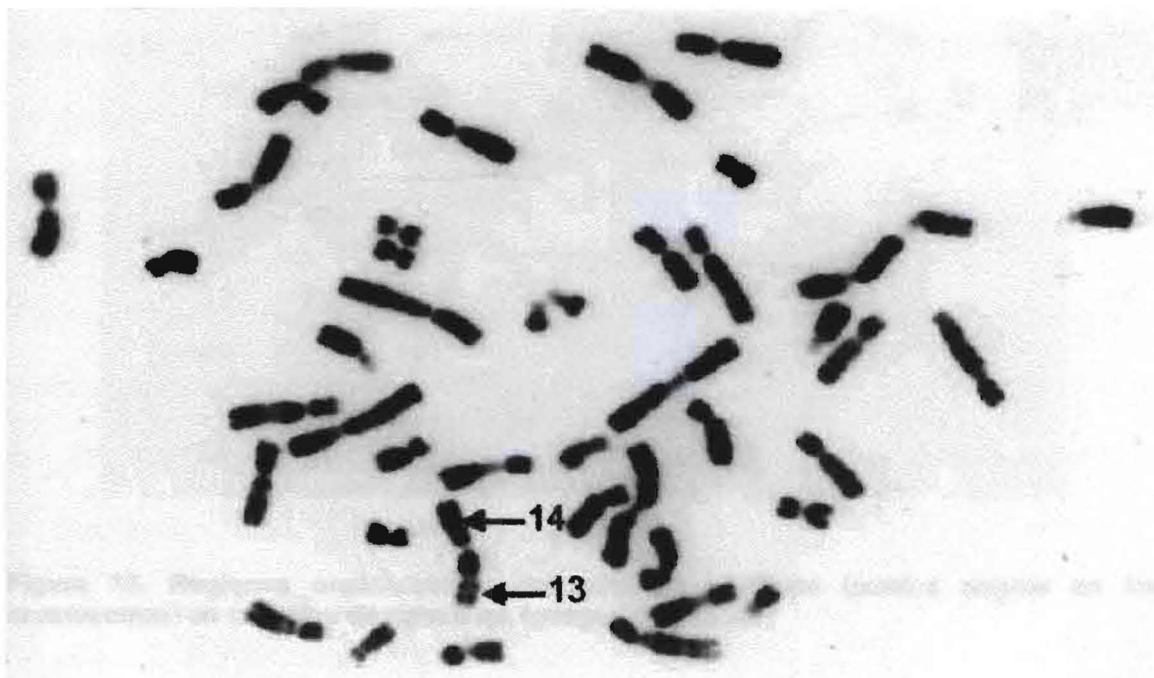


Figura 34. Translocación Robertsoniana humana en cariotipo $2n= 45XX$ con bandas R-replicativas obtenidas de linfocitos de sangre periférica. La flecha muestra la translocación entre los cromosomas 13/14. (Cortesía del Laboratorio INGEIN Clínica Las Vegas)

4.1.2.2.8. Regiones NOR. Esta tinción revela las regiones activas del genoma donde se localizan los genes que codifican para la transcripción de RNA ribosomal. Por lo tanto, mediante esta técnica se podrán establecer polimorfismos fisiológicos, consistentes en la expresión o no de regiones implicadas en la síntesis de RNAr (Figura 35). Dado el carácter de polimorfismo funcional de estas bandas, se sugiere determinar las regiones que contienen RNAr, en diferentes organismos.



Figura 35. Regiones organizadoras del nucleólo positivas (puntos negros en los cromosomas) en cariotipo de *Agouti* sp. (guagua de páramo)

4.1.2.2.9. Protocolo para REGIONES NOR. (Goodpasture y Bloom, 1975)

- Se deben utilizar láminas con 5 días de maduración a temperatura ambiente.
- Colocar 3 gotas de AgNO_3 al 50% sobre la lámina y cubrir con laminillas.
- Colocar en cámara húmeda a 37°C por 24 horas. (esto se debe realizar en cuarto oscuro).
- Lavar con agua desionizada y secar la lámina a temperatura ambiente.
- Colorear con solución de trabajo de Giemsa por 10 minutos se lava y se flamea suavemente.

En conclusión, para efectuar los diferentes tipos de bandas, las preparaciones deben cumplir condiciones estándares y por lo general son propios de cada laboratorio, una de estas condiciones que son críticas para el bandeo es el tiempo de goteada de la muestra. Se debe tener en cuenta el tiempo promedio de maduración de placa para los diferentes bandas cromosómicas.

Para efectuar una caracterización citogenética de una especie es recomendable realizar el mayor número de bandas no sólo para lograr un cariotipo preciso si no también para obtener la máxima información respecto a la estructura y función de su genoma.

4.1.3. SISTEMA DE NOMENCLATURA EN CROMOSOMAS BANDEADOS.

4.1.3.1. Identificación y Definición de Marcadores, Regiones y Bandas.

Cada cromosoma en el complemento celular somático humano consta de una serie continua de bandas, con áreas sin bandear. Una banda, es una parte del cromosoma claramente distinguible de partes adyacentes en virtud de su intensidad de coloración más clara o más oscura.

Cada banda se encuentra agrupada en áreas más grandes denominadas regiones que cubren todo el cromosoma. Una región está definida como un área de un cromosoma ubicada entre dos marcas específicas y adyacentes a lo largo de cada uno de los brazos cromosómicos. Estas marcas son rasgos morfológicos distintivos e importantes en la identificación de cada uno de los cromosomas e incluyen los extremos de los cromosomas (telómeros), el centrómero y ciertas bandas evidentes. Las bandas y las regiones son numeradas del centrómero hacia afuera.

El patrón de bandeo original fue descrito en la Conferencia de Paris (1971) y se basó en los patrones observados en diferentes células teñidas con las técnicas de bandeo Q, G y R. Los patrones de bandeo obtenidos con esos métodos de tinción fueron tan acordes que permitieron construir un diagrama único representativo de las tres técnicas. Las bandas fueron diseñadas en las bases de sus puntos

medios y no por sus márgenes. La intensidad fue tomada en consideración en determinar cuales servían como marcas en cada cromosoma para dividirlo en regiones naturales fácil y morfológicamente reconocibles.

4.1.3.2. Designación de regiones, bandas y subbandas.

Las regiones y bandas son numeradas consecutivamente del centrómero hacia fuera de la longitud de cada brazo cromosómico. Los símbolos p y q son usados para designar respectivamente, los brazos cortos y largos de cada cromosoma. El centrómero (cen) en sí mismo es designada 10 la parte delantera del brazo corto es p10 y del brazo largo q10. Las dos regiones adyacentes al centrómero son marcadas como 1 en cada brazo, la próxima, regiones más distales son 2 y así sucesivamente. Una banda usada como marcador es considerada como perteneciente completamente a la región distal de la marca y está de acuerdo al número de banda de 1 en esa región.

Para designar una banda en particular, se requieren cuatro caracteres: el número del cromosoma, el símbolo del brazo, el número de la banda dentro de la región. Esos ítems, se colocan sin espacio o puntuación. Ejemplo, **1p31** indican cromosoma 1, brazo corto, región 3, banda 1. Las subbandas se colocan seguidas de un punto después de la banda.

4.1.3.3. Bando de alta resolución.

La nomenclatura para preparaciones cromosómicas en profase y prometáfase de alta resolución por ISCN (1981) es una extensión de la nomenclatura para el patrón de bando para cromosomas metafásicos establecidos en la Conferencia de París (1971) y la ISCN (1978). El sistema original fue revisado para incluir mayor número de bandas de cromosomas .

Las técnicas de bando de alta resolución pueden aplicarse en diferentes estados del ciclo celular: profase, prometáfase o interfase (por métodos que inducen condensación prematura de cromosomas). Por lo tanto, el número de bandas discernibles (Figura 11A y 11B) depende no sólo del estado de condensación cromosómica sino también de la técnica de bando usada.

Los idiogramas estándares representan cromosomas correspondientes a proximadamente 400, 550 y 850 bandas. Sin embargo, se pueden visualizar más bandas.

La nomenclatura original se basó más en el patrón de bandas que en las medidas, la variación en la intensidad de tinción que es dependiente de la técnica de tinción, no se reflejó en idiogramas en ISCN (1981). En alta resolución un idiograma sólo muestra los patrones blancos y negros, los cuales llegan a ser difíciles de usar.

4.1.4. EJEMPLO DE UN TALLER DE CITOGENÉTICA.

En 1999, en el Curso Citogenética Avanzada, el estudiante Iván Darío Loaiza Díaz, realizó el siguiente ejercicio con el fin de proponer el cariotipo de la especie *Dasyprocta punctata* (ñequé) y realizar la respectiva nomenclatura basada en la norma de ISCN.

El estudiante, recibió una fotografía de una mitosis con coloración homogénea, de la cual debía extraer toda la información requerida para realizar un cariotipo sin bandas, con la asesoría del profesor del curso.

Los resultados consignados en su trabajo se muestran a continuación:

4.1.4.1. INDICES Y MEDIDAS MORFOMETRICAS DE LOS CROMOSOMAS:

En la siguiente Tabla, se registran los cálculos de los índices braquial y centromérico, la longitud relativa, la longitud total y las longitudes de los brazos cortos (p) y largos (q) de los 64 cromosomas obtenidos a partir de una muestra de sangre periférica del ñequé (*Dasyprocta sp.*) un hystricomorfo mamífero estudiado en nuestro Laboratorio. Todos los estudiantes que cursaron la asignatura realizaron el mismo ejercicio y los resultados son sorprendentes.

Tabla 8. Parámetros de medidas utilizados para proponer un cariotipo 2n=64XY sin bandas.

2n =64	Longitud Total	Longitud brazo p	Longitud brazo q	Longitud relativa	Indice braquial	Indice Centromérico.	Clasificación por ubicación centrómero
X	14	6	8	3.07	1.33	0.42	Sexual
1	12	5	7	2.63	1.4	0.41	SM
2	12	5	7	2.63	1.4	0.41	SM
3	10	3	7	2.19	2.33	0.3	SM
4	10	3	7	2.19	2.33	0.3	SM
5	10	3.5	6.5	2.19	1.85	0.35	SM
6	10	3.5	6.5	2.19	1.85	0.35	SM
7	10	4.5	5.5	2.19	1.22	0.45	SM
8	10	4.5	5.5	2.19	1.22	0.45	SM
9	10	5	5	2.19	1	0.5	M
10	10	5	5	2.19	1	0.5	M
11	9	4	5	1.97	1.25	0.44	SM
12	9	4	5	1.97	1.25	0.44	SM
13	8	4	4	1.75	1	0.5	M
14	8	4	4	1.75	1	0.5	M
15	8	3.5	4.5	1.75	1.28	0.43	SM
16	8	3.5	4.5	1.75	1.28	0.43	SM
17	8	3.5	4.5	1.75	1.28	0.43	SM
18	8	3.5	4.5	1.75	1.28	0.43	SM
19	8	2.5	5.5	1.75	2.2	0.31	SM
20	8	2.5	5.5	1.75	2.2	0.31	SM
21	8	1	7	1.75	7	1.25	ST
22	8	1	7	1.75	7	1.25	ST
23	8	4	4	1.75	1	0.5	M
24	8	4	4	1.75	1	0.5	M
25	8	4	4	1.75	1	0.5	M
26	8	4	4	1.75	1	0.5	M
27	7.5	3.5	4	1.64	1.14	0.46	M
28	7.5	3.5	4	1.64	1.14	0.46	M
29	7.5	3.5	4	1.64	1.14	0.46	M
30	7.5	3.5	4	1.64	1.14	0.46	M
31	7	2	5	1.53	2.5	0.28	SM
32	7	2	5	1.53	2.5	0.28	SM
33	7	1.5	5.5	1.53	3.6	0.21	A
34	7	1.5	2.5	1.53	3.6	0.21	A
35	7	2	5	1.53	2.5	0.28	SM
36	7	2	5	1.53	2.5	0.28	SM
37	7	3.5	3.5	1.53	1	0.5	M
38	7	3.5	3.5	1.53	1	0.5	M

339

Continúa Tabla 7

39	7	3	4	1.53	1.33	0.42	SM
40	6	2.5	3.5	1.31	1.4	0.41	SM
41	6	2.5	3.5	1.31	1.4	0.41	SM
42	6	2.5	3.5	1.31	1.4	0.41	SM
43	6	2.5	3.5	1.31	1.4	0.41	SM
44	6	2.5	3.5	1.31	1.4	0.41	SM
45	6	2.5	3.5	1.31	1.4	0.41	SM
46	6	2.5	3.5	1.31	1.4	0.41	SM
47	5	1.5	3.5	1.09	2.3	0.31	SM
48	5	1.5	3.5	1.09	2.3	0.31	SM
49	5	2.5	2.5	1.09	1	0.5	M
50	5	2.5	2.5	1.09	1	0.5	M
51	5	2	3	1.09	1.5	0.4	SM
52	5	2	3	1.09	1.5	0.4	SM
53	4.5	1.5	3	.98	2	0.33	SM
54	4.5	1.5	3	.98	2	0.33	SM
55	4.5	1.5	3	.98	2	0.33	SM
56	4.5	1.5	3	.98	2	0.33	SM
57	4.4	2.2	2.2	.96	1	0.5	M
58	4.4	2	2	.87	1	0.5	M
59	3.5	1.5	2	.76	1.33	0.42	SM
60	3.5	1.5	2	.76	1.33	0.42	SM
61	3	1.5	1.5	.65	1	0.5	M
62	3	1.5	1.5	.65	1	0.5	M
Y	3			.65			sexual

Teniendo en cuenta la longitud total (Tabla 8) de cada uno de los cromosomas de la especie anónima, los 64 cromosomas fueron organizados en orden decreciente de tamaño como se muestra en la Figura 32. Por sus medidas morfométricas, los 32 pares fueron agrupados como homólogos, excepto el par sexual, que está representado por el cromosoma más largo (X) y el más pequeño (Y).

4.1.4.2. PROPUESTA DE CARIOTIPO

Partiendo de las medidas morfométricas y los índices calculados para cada cromosoma, los pares homólogos son organizados por grupos que tengan un tamaño y forma similares, así:

Cromosomas grandes: se consideran aquellos entre 9-12 mm de longitud total.

Cromosomas medianos: aquellos entre 6-8 mm de longitud total.

Cromosomas pequeños: aquellos entre 4-5 mm de longitud total.

Cromosomas diminutos : aquellos entre 3-3.5 mm de longitud total.

Cromosomas sexuales : aquellos que no poseen par homólogo.

Los índices calculados y la longitud relativa se calculan como se describe en el capítulo 4, apartes 4.1.1.2 y 4.1.1.3 y en la Tabla 7.

4.1.4.3. PARES CROMOSOMICOS HOMÓLOGOS

Se consideran dos cromosomas homólogos aquellos que además de su similitud en tamaño y forma tienen la misma posición del centrómero. Teniendo en cuenta lo anterior, para este cariotipo la propuesta es la siguiente:

P1 (1,2)	P12 (37,38)	P23 (33,34)
P2 (9,10)	P13 (15,16)	P24 (49,50)
P3 (7,8)	P14 (17,18)	P25 (51,52)
P4 (5,6)	P15 (19,20)	P26 (47,48)
P5 (3,4)	P16 (31,32)	P27 (57,58)

P6 (11,12)	P17 (35,36)	P28 (53,54)
P7 (13,14)	P18 (39,40)	P29 (55,56)
P8 (23,24)	P19 (41,42)	P30 (59,60)
P9 (25,26)	P20 (43,44)	P31 (61,62)
P10 (27,28)	P21 (45,46)	P32 (1,64) Sexuales
P11 (29,30)	P22 (21,22)	X Y

4.1.4.4. GRUPOS CROMOSOMICOS PROPUESTOS

Grupo A → Pares 1, 2, 3, 4, 5, 6.

Conformado por los pares de cromosomas más grandes (9-12 mm), metacéntricos y submetacéntricos.

Grupo B → Pares 7, 8, 9, 10, 11, 12.

Conformado por los pares de cromosomas medianos (6-8 mm), únicamente metacéntricos.

Grupo C → Pares 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21.

Conformado únicamente por los pares de cromosomas medianos (6-8 mm) submetacéntricos.

Grupo D → Pares 22, 23.

Conformado por los pares de cromosomas medianos (6-8 mm), acrocéntricos y subtelocéntricos.

Grupo E → Pares 24, 25, 26, 27, 28, 29.

Conformado por los pares de cromosomas pequeños (4-5 mm), metacéntricos y submetacéntricos.

Grupo F → Pares 30, 31.

Conformado por los pares de cromosomas mas pequeños (3-3.5 mm), metacentricos y submetacentricos.

Grupo G → Par 32.

Conformado por los pares de cromosomas sexuales (X, Y).

COMENTARIO FINAL.

En la Figura 36, se muestra el cariotipo propuesto por el estudiante Iván Loaiza después de haber realizado su ejercicio investigativo. En la Figura 37, se muestra el cariotipo propuesto por otra estudiante del mismo Curso, después de haber realizado sus propias medidas y haber utilizado sus propios criterios para organizar los pares homólogos. Si este mismo ejercicio se hubiera colocado con un cariotipo que hubiera sido bandeado con bandas R-replicativas (Figura 19), el resultado hubiera sido muy distinto. Se hubieran identificado como primeros los cromosomas X o Y los cuales no tienen homólogos en su patrón de bandas y ambos estudiantes hubieran tenido una alta probabilidad de haber acertado al menos en los pares homólogos. Igual hubiera ocurrido si el estudiante opta por utilizar el bandeo G como se muestra en la Figura 27 aun cuando hubiera sido más difícil ubicar los cromosomas sexuales.

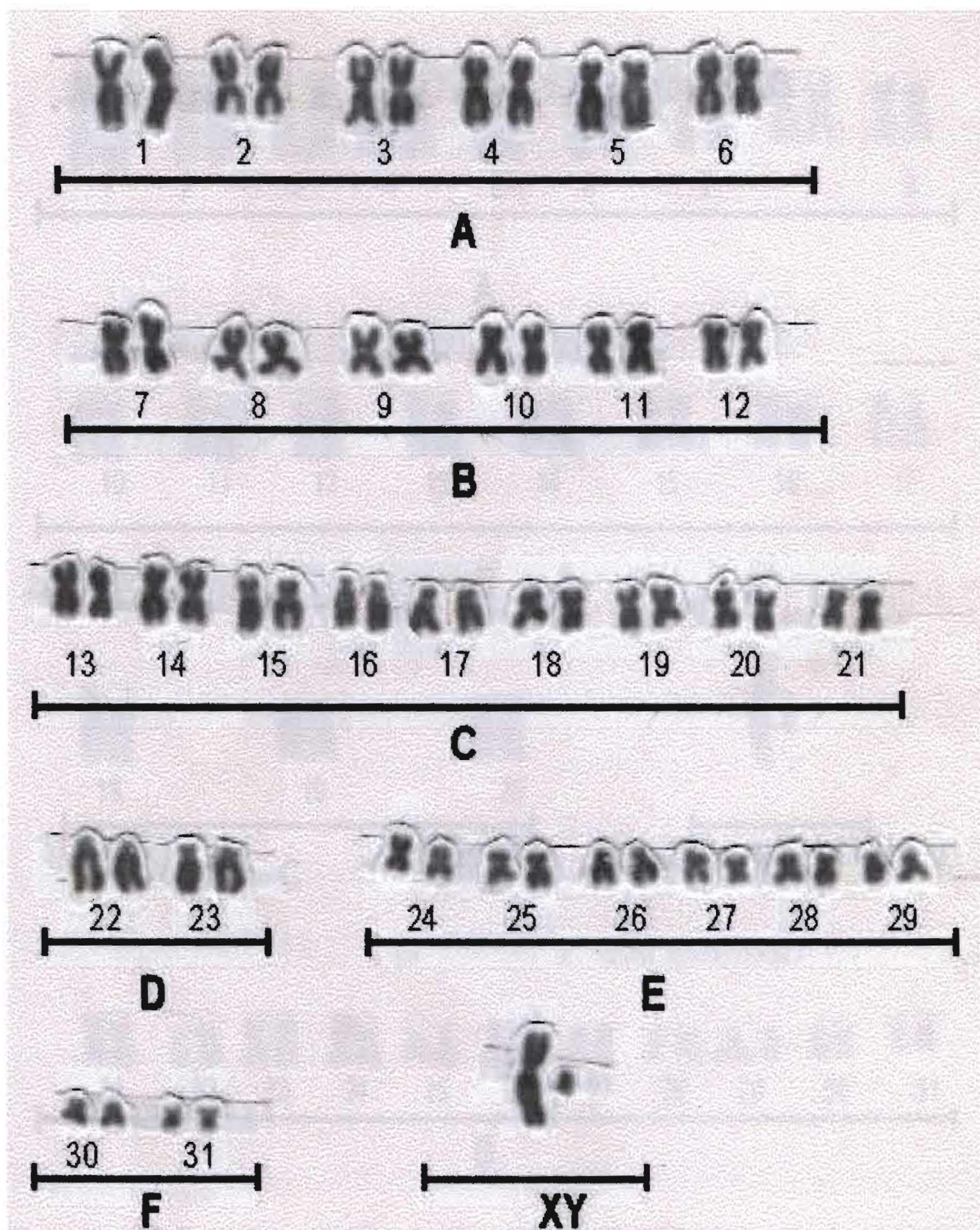


Figura 36. Cariotipo de *Dasyprocta* sp (ñeque, guatín) $2n = 64XY$ organizado por Iván Darío Loaiza Gómez tomando como parámetros los descritos en la Tabla 8.

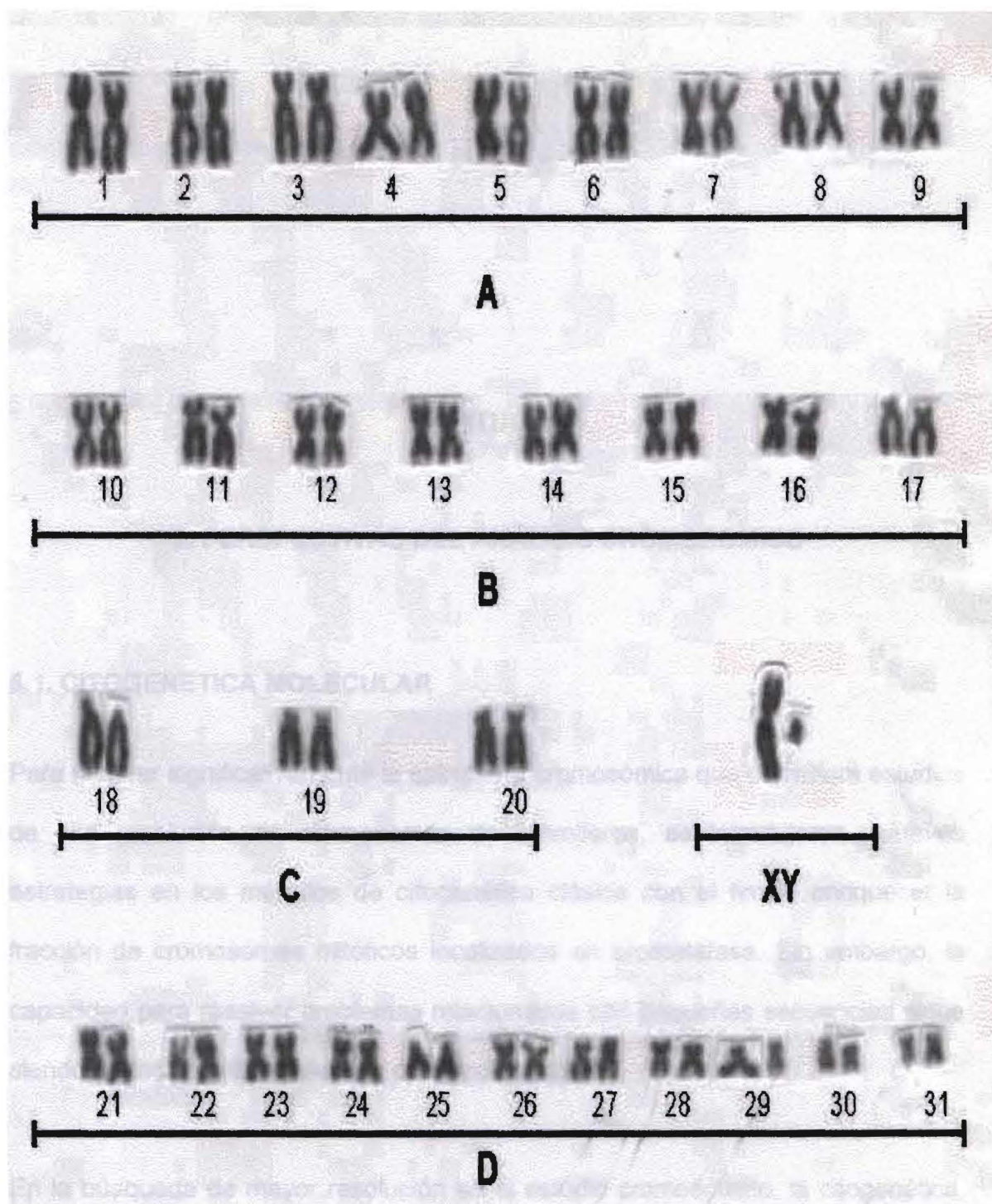


Figura 37. Cariotipo de *Dasypsecta* sp (ñeque, guatín) $2n= 64XY$ organizado por Luz Adriana Ramírez Arias tomando como parámetros los descritos en la Tabla 7. No se muestran los cálculos realizados por ella.

CAPÍTULO 5

5. PERSPECTIVAS DEL ANÁLISIS CROMOSOMICO

5.1. CITOGENETICA MOLECULAR

Para mejorar significativamente la estructura cromosómica que permitiera estudios de alta resolución en cromosomas de mamíferos, se introdujeron nuevas estrategias en los métodos de citogenética clásica con el fin de enriquecer la fracción de cromosomas mitóticos localizados en prometafase. Sin embargo, la capacidad para resolver problemas relacionados con pequeñas secuencias sigue siendo un factor limitante para la citogenética clásica.

En la búsqueda de mayor resolución en el estudio cromosómico, la citogenética, recientemente ha incorporado los principios de la *hibridación in situ fluorescente* (FISH) la cual ha sido de gran utilidad en los diferentes campos de la investigación relacionados con citogenética humana o citogenética animal.

La técnica FISH permite detectar desde una región de un cromosoma, un cromosoma completo hasta la totalidad de genoma. De esta manera se puede visualizar regiones teloméricas o regiones intersticiales que posean un mínimo de 5 mil pares de bases de longitud (Figura 38).

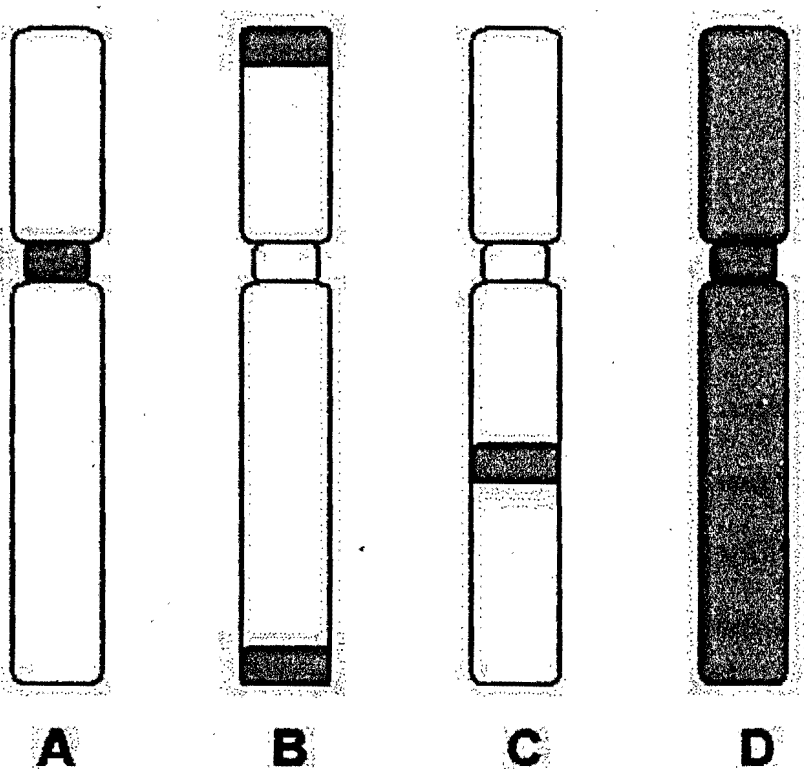


Figura 38. Esquema que representa los diferentes tipos de sondas FISH. A. Sonda centromérica. B. Sondas teloméricas. C. Sonda de secuencia única. D. Sonda para todo el cromosoma o pintado cromosómico.

Las principales pruebas FISH utilizadas actualmente con aplicaciones potenciales, se describen a continuación:

5.2. SONDAS CENTROMERICAS. (Figura 39)

La sonda centromérica contiene secuencias de DNA repetitivo localizada en regiones centromérica o pericentromérica de cromosomas de mamíferos, y se puede usar para hibridar cromosomas metafásicos o núcleos interfásicos. Potencialmente se puede construir sondas que reconozcan al centrómero de un cromosoma en particular o de todos los cromosomas del genoma, por lo cual se le llama sonda pan-centromérica.

La sonda centromérica específica de un cromosoma en particular incluyendo los cromosomas sexuales, es útil para reconocer aneuploidías en humanos. Sin embargo, tendría la desventaja de no poder distinguir entre un cromosoma estructuralmente normal de otro cuya estructura esté desbalanceada. La sonda centromérica, también se puede usar en la determinación de mosaicismo cromosómico usando núcleos interfásicos ya sea en neoplasias, o en productos de abortos.

En animales, la sonda Centromérica específica de cromosoma puede servir para determinar cromosomas homólogos en especie emparentadas, o para determinar el origen del centrómero de un cromosoma que filogenéticamente ha sufrido rearrreglos estructurales en los cromosomas de una especie a otra.

Las sondas pancentroméricas del genoma de una especie, pueden ser usadas para establecer relaciones filogenéticas entre centrómeros homólogos de especies emparentadas.



Figura 39. Mitosis humana 46XX con sonda pancentromérica específica. (Tomado de Karp, 1999)

5.3. SONDAS TELOMERICAS. (Figura 40)

En el telómero o segmento terminal de cada cromosoma se encuentra de manera conservada la secuencia repetida (TTAGGG)_n. Estas secuencias se cree tienen

como función preservar la integridad del cromosoma a nivel estructural, por lo tanto, son indispensables para la supervivencia y longevidad de toda célula eucariótica ya que estas regiones son determinantes para la replicación y estabilidad de todos los cromosomas.



Figura 40. Cromosomas humanos 46XX con sonda pantelomérica específica. (Tomado de Karp, 1999)

Actualmente, en humanos, se han resuelto varios casos clínicos asociados con translocaciones crípticas con sondas teloméricas ya que están disponibles para cada telómero. Estas sondas también son útiles en la detección de translocaciones cromosómicas recíprocas, regiones teloméricas intersticiales lo

cual podría reflejar cicatrices evolutivas de un rearrreglo cromosómico ocurrido en un ancestro.

5.4. SONDA DE SECUENCIA ÚNICA (USP). (Figura 41)

La sonda de secuencia única de un locus específico se puede aplicar tanto en núcleos interfásicos y en cromosomas metafásicos. Debido a que cada USP es gen específico y por tanto de secuencia única, resulta ideal para la detección de microdelecciones, microduplicaciones, isogenes y pseudogenes que no se pueden detectar por la citogenética clásica.

La sonda USP puede ser usada en la detección de translocaciones recurrentes y aneuploidías, así como también en la localización de genes conservados filogenéticamente, en el genoma de diferentes especies.



Figura 41. Cromosomas humanos 46XX con sonda fluorescente de secuencia única única.
(Tomado de Karp, 1999)

5.5. PINTADO CROMOSOMICO 6 SONDAS PARA UN CROMOSOMA COMPLETO. (Figura 42)

Son un conjunto de muchas sondas complementarias para un sitio específico a lo largo de la longitud de un determinado cromosoma. En este caso el cromosoma blanco fluoresce totalmente de color específico de donde se deriva el nombre de la prueba, esta prueba es de utilidad para la detección de aneuploidías, y translocaciones recurrentes así como también en la determinación del origen de cromosomas marcadores. Además, el pintado cromosómico resulta efectivo para determinar con precisión el punto de quiebre en una translocación balanceada, útil para realizar el procedimiento denominado ZOO-FISH lo cual consiste en aplicar la sonda de cada cromosoma humano a individuos primates para determinar el grado de homología entre los cromosomas de las dos especies.



Figura 42. Cromosomas humanos coloreados con sonda específica de cada cromosoma o pintado cromosómico. (Tomado de Karp, 1999)

5.6. OTRAS PRUEBAS FISH.

5.6.1. Hibridación genómica comparada (HGC). (Figura 43)

En 1992 se publicó sobre el desarrollo de una nueva estrategia citogenética para detectar ganancias y pérdidas de material genético muy frecuentes en las muestras tumorales. Esta técnica conocida como **hibridación genómica comparada** es la primera herramienta de citogenética molecular que permite un análisis global del genoma y se ha convertido en una de las técnicas más útiles en el cribaje de genomas.

La HGC permite detectar cambios en el número de copias de secuencias de DNA y proporciona un mapa de aquellas regiones cromosómicas que se ganan y pierden en el DNA de una muestra. En genética clínica, la HGC se está utilizando cada vez más, como complemento a la citogenética convencional en el diagnóstico de reorganizaciones cromosómicas desequilibradas, de cromosomas marcadores y en determinar el origen de material extracromosómico (diminutos dobles) y de regiones de tinción homogénea.

De un lado, la HGC puede identificar en un sólo experimento aquellas regiones que se hayan ganado o amplificado como indicadores de la presencia de oncogenes, así como regiones delecionadas o perdidas como indicadoras de genes supresores de tumores. Por otro lado, los cambios genéticos equilibrados como reorganizaciones cromosómicas, en la mayoría de los casos encontrados en las enfermedades hematológicas resultan no detectables por HGC.

Al contrario en los tumores sólidos, especialmente en carcinomas, predominan las reorganizaciones genómicas desequilibradas, haciendo de estos tumores unas dianas ideales para el análisis por HGC.

La HGC está basada en una hibridación *in situ* modificada que consiste en marcar diferencialmente el DNA problema y un DNA de referencia normal con fluorocromos por ejemplo, verde y rojo, respectivamente. Luego son hibridados simultáneamente sobre extensiones cromosómicas provenientes de individuos normales. Las diferencias en el número de copias entre el genoma problema y el de referencia se ven como diferencias en la intensidad de fluorescencia verde:rojo.

Las ganancias o amplificaciones en el DNA problema se observan como regiones cromosómicas con la fluorescencia incrementada, mientras que las pérdidas o deleciones se observan con una fluorescencia disminuida respecto al control. De esas observaciones, se puede realizar la cuantificación de los cocientes de fluorescencia del DNA problema respecto al DNA de referencia mediante un sistema de análisis de imágenes digitales.

Entre las ventajas de la HGC es que se requiere poca cantidad (1 μ g), que puede ser fácilmente obtenido a partir de tejido fresco, congelado o, incluso, de tejidos viejos fijados en parafina. No se necesita cultivo ni preparación de metafases de la muestra que se analiza. Además, no depende del conocimiento previo de la

naturaleza de las aberraciones genéticas o de la disponibilidad de las sondas para estas regiones. De otro lado, un único experimento produce datos de todas las regiones del genoma.

La HGC también tiene algunas limitaciones. Las reordenaciones cromosómicas equilibradas no se pueden detectar. No facilita información del tipo de reordenaciones. Como que los desequilibrios cromosómicos sólo se pueden detectar cuando están presentes en la mayoría de células de la muestra, la CGH no puede ser aplicada para estudiar la variabilidad clonal de las muestras sometidas a estudio. Pero, por otro lado, sirve para distinguir desequilibrios cromosómicos producidos al azar en unas pocas células del tumor de esas anomalías mayoritarias.

La HGC es una herramienta para identificar aberraciones genéticas desconocidas, pero una vez las regiones cromosómicas alteradas, están identificadas, es mejor recurrir a los métodos moleculares apropiados. La combinación de la HGC con otros ensayos genéticos moleculares son muy útiles en la investigación oncológica ya que los resultados de la CGH a menudo mapean cambios genéticos en regiones cromosómicas de genes conocidos. Los métodos moleculares específicos son altamente recomendables para validar los resultados de la HGC y para proporcionar datos sobre el papel de genes individuales.

La hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), puede estudiar las pérdidas de heterocigosidad y el Southern blot permite limitar las regiones indicadas por la

CGH y permite localizar genes específicos del desarrollo tumoral. Gracias a los resultados de la HGC combinada con la FISH y a la secuenciación génica se han identificado dos nuevos genes tumorales que no habían sido mapeados.

Las aplicaciones de la HGC en el estudio de la genética del cáncer, incluyen la caracterización de puntos calientes para reorganizaciones genómicas desequilibradas, la definición de nuevos genes implicados en alteraciones en el número de copias, el análisis de la progresión y evolución clonal del cáncer, así como la subclasificación y la evaluación pronóstica del cáncer.

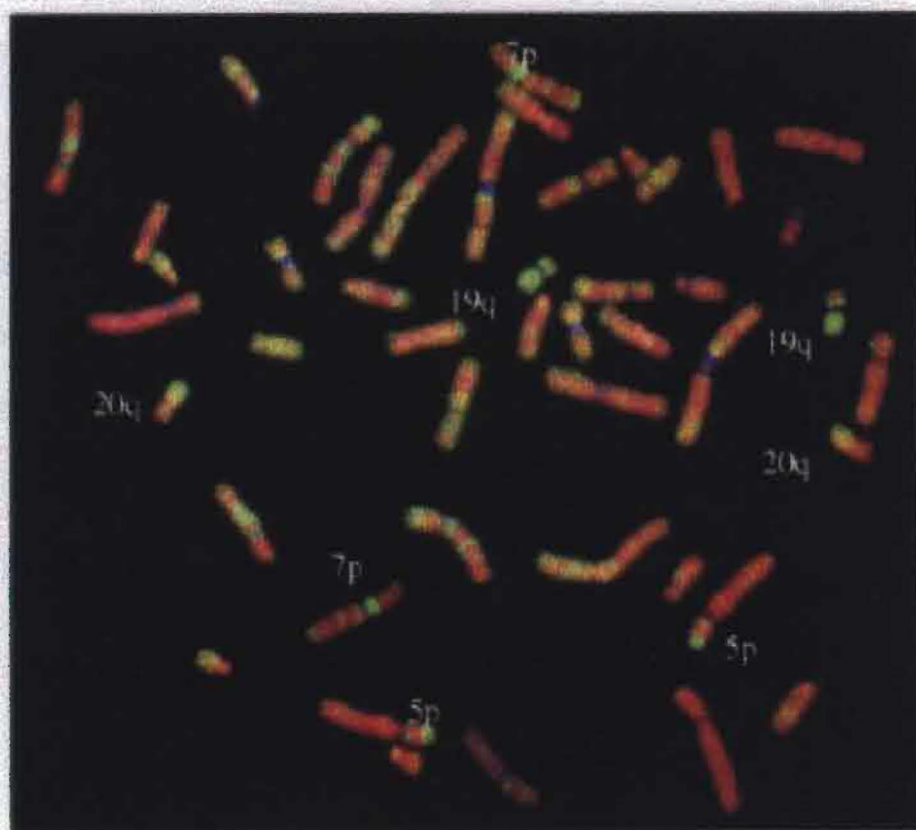


Figura 43. Hibridación genómica comparada de cariotipo humano usando sondas fluorescentes. (Tomado de ist-socrates.berkeley.edu/mutagen/spr98.html)

5.6.2. Cariotipo espectral. (Figura 44)

Se denomina también FISH digital multicolor. Para esta prueba se usa sonda de ADN proveniente de una genoteca de cada cromosoma y se usa como ADN blanco un portaobjetos que contiene mitosis, en este caso de cromosomas humanos. La sonda de ADN para cada cromosoma es marcada con mezclas en diferentes proporciones de diferentes fluorocromos.

Utilizando un microscopio adaptado para evaluar FISH, se excita cada fluorocromo a una longitud de onda dada, y se registra la señal fluorescente como un color específico. Esta imagen se lleva a un procesador de imagen computarizado usando un software para tal fin, con el cual se pueden detectar cada uno de los colores que forman la mezcla diferencial de todos los fluorocromos.

De esta manera, cada cromosoma se muestra de un color diferente pudiéndose detectar todos los posibles rearrreglos tipo translocaciones, aneuploidías libres o por translocaciones Robertsonianas, sin embargo, no permite identificar inversiones principalmente paracentroméricas.



Figura 44. Cariotipo espectral usando mezclas de sondas fluorescentes para cada cromosoma y asistido por un software. (Tomado de Karp, 1999)

5.7. ASPECTOS TÉCNICOS DE LA FISH

Para la realización de la FISH se usan placas con excelentes extendidos cromosómicos metafásicos o células en estado de interfase, obtenidas para análisis cromosómico. Se hibridan sondas específicas para una región o todo el cromosoma completo.

La base principal del método es el uso de sondas de DNA de cadena simple marcada directa o indirectamente con un fluorocromos o con agentes modificados químicamente como la biotina o dioxigenina. Esta sonda marcada se une a una

secuencia presente en el genoma donde híbrida de manera complementaria ya sea en el cromosoma metafásico o en la somalina desconocida que forma el núcleo. En general, el DNA total se contracolora con otro fluorocromo que genera un contraste en la tinción.

El microscopio de fluorescencia debe estar equipado con un filtro específico para el fluorocromo marcador de la sonda y con otro filtro para el fluorocromo de contraste o con filtros que permiten visualizar simultáneamente diferentes fluorocromos.

El uso de cámaras digitales adaptadas al microscopio ha permitido la detección de bajos niveles de emisión de coloración las cuales pueden ser captadas y procesadas con un software con el fin incrementar la sensibilidad en la detección de la sonda. La emisión de fluorescencia por la sonda marcada se desvanece con el tiempo por lo tanto no se puede mantener preparaciones permanentes que se puedan almacenar en ausencia de luz para prolongar un poco su capacidad de emisión.

6. BIBLIOGRAFÍA DE REFERENCIA

Capítulo 1.

Macgregor, H. C. An Introduction to Animal Cytogenetics. Londres : Chapman & Hall, 1993. 236p.

Sessions, S.K. Chromosomes: Molecular Cytogenetics. In: Hillis, D.; Moritz, C. and Mable, B. Molecular Systematics. 2a ed. Sunderland: Sinauer Associates, 1996. p 121-168.

Capítulo 2.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J. Raff, Roberts, R. and Watson, J.D. Molecular Biology of the Cell. 1993. Third Edition. Garland Publishing. Inc., New York & London.1366p

Camargo, M. y Cervenka, J. Patterns of DNA Replication of Human Chromosomes : II. Replication Map and Replication Model. En: American Journal of Human Genetics. No. 34 (1982); p. 757-780.

Cooper, G.M. The Cell. A Molecular Approach. Second Edition. ASM Press. Washington D.C. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. 689p.

Griffiths, A.J.F., Gelbart, W.M., Miller, J.H. and Lewontin R.C. 1999. Modern Genetic Analysis. W.H.Freeman and Company. New York.

Capítulo 3.

Dutrillaux, B. et al. Sequence of DNA replication en 277 R- and Q-bands of human chromosomes using BrdU treatment. En: Chromosoma. No. 58 (1976); p. 51-61

Freshney, R.I. Culture of Animals Cells. A Manual of Basic Technique. Fourth Edition. Wiley-Liss. 2000. 577p.

Freshney, R.I. Editor. Animal Cell Culture. A Practical Approach. Second Edition. Oxford University Press. 1992. 329p

Davis, J.M. Basic Cell Culture. A Practical Approach. Oxford University Press. 1996. 300p

Karp, G. Cell and Molecular Biology. Concepts and Experiments. 1999. John Wiley & Sons, Inc. Second Edition. P 434, 437, 514, 530, 533

López, J.B. y Camargo, M. Cultivos de linfocitos humanos en ausencia de suero bovino fetal. Cinética proliferativa y bandeo de replicación de alta resolución. Biomédica, supl. 1 , p 23, 1985.

Capítulo 4.

Arrighi, F.E. and Hsu, T.C. Localization of heterochromatin in human chromosomes. 10: 81-86 (1971).

Curso Teórico-Práctico Citogenética de Mamíferos y Conservación de Especies. Instituto de Genética. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. D.C. 22 a 26 de Octubre de 2001. Profesores participantes. Marta Lucía Bueno, Ligia Jiménez, Miriam Leibovici, Monserrat Ponsa, Carlos Arturo Sánchez y Olga María Torres.

Goodpasture, C. and Bloom, S.E. visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma* 58: 37-50 (1975)

Howell, W. M.; Denton, T.E and Diamond, J. R. Differential staining of satellite region of human acrocentric chromosomes. *En* : Human Genetics. Vol. 43 (1978); p. 53–56.

International Standing Committee On Human Cytogenetic Nomenclature. ISCN : An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Memphis, Tennessee, USA : Felix Mitelman, 1995. 114 p.

ISCNDA 1989: International System for Cytogenetic Nomenclature of Domestic Animals (1989). The Second International Conference on Standardización of Domestic Animals Karyotypes. *En*: Cytogenetics and Cell Genetics. Vol. 53, No. 2-3 (1990); p. 65-79.

Juan Bautista López Ortiz, María Elena Márquez Fernández y Diego Hoyos Duque. 1997. CARIOTIPO CITOGÉNÉTICO DE LA GUAGUA (*Agouti paca*). Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín. Vol 50 No 2, p 5- 18

Juan B. López O., María E. Márquez F. y Edna J. Márquez F. 1999. DETECCIÓN DEL QUIMERISMO CELULAR EN FREEMARTIN POR BANDEO RGB. Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín. Vol 52 No 1, p 539- 547

López, J.B. y Camargo, M. Visualización de regiones de replicación temprana en el cromosoma X inactivo. Estudio con FdUrd y Metotrexate. *Biomédica*, supl. 1, p 29, 1985.

Mónica Reinartz E. María Elena Márquez F. Luz Adriana Ramírez A. Juan Bautista López O. 2001. RELACIÓN ENTRE QUIMERISMO XX/XY Y EL FENOTIPO PSEUDOHERMAFRODITA MASCULINO EN PORCINOS. Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín. Vol 54 # 1y 2 p 1159-1167.

Moorhead, P. S., Nowell, P.C., Mellan, W.J., Battips, D.M., Hungerford, D.A. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. En: Experimental Cell Research, No. 20 (1960); p. 613-616.

Seabright, M. A rapid banding technique for human chromosomes. Lancet 2: 971 (1971)

Sehested, J. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Exp. Cell. Res. 75: 304- 306 (1972)

Sumner, A. T. and Evans, M. J. Mechanism involved in the banding of chromosomes with Quinacrine and Giemsa. En : Experimental Cell Research. Vol. 81 (1973); p. 223 – 226.

Trujillo, E., López, J.B. y Camargo, M. Análisis comparativos de cuatro métodos para cuantificar los estadios del ciclo proliferativo en células CHO. Revista ACCB, p 103 - 106, 1986.

Capítulo 5.

Cooper, G.M. The Cell. A Molecular Approach. Second Edition. ASM Press. Washington D.C. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. 689p.

Griffiths, A.J.F., Gelbart, W.M., Miller, J.H. and Lewontin R.C. 1999. Modern Genetic Analysis. W.H.Freeman and Company. New York.

Karp, G. Cell and Molecular Biology. Concepts and Experiments. 1999. John Wiley & Sons, Inc. Second Edition. P 434, 437, 514, 530, 533

Yung, J.F. 1996. New FISH probes the end in sight. Nature Genetics. Vol 13. Septiembre.

ANEXO 1. RECOMENDACIONES

1.1. Manejo de Material Biológico

Cualquier material biológico incluyendo las muestras de sangre se deben considerar potencialmente peligroso, por lo tanto, se toman precauciones tales como:

- Usar guantes. Además, el material de vidrio o plástico que haya estado en contacto con material biológico debe ser lavado con hipoclorito para eliminar microorganismos, previo a su lavado regular.
- Limpiar con hipoclorito (clorox o decol) el mesón de trabajo antes y después de su uso.
- En caso de pincharse con agujas contaminadas lavarse la herida con decol o isodine y dejar secar.
- Papel, algodón, jeringas y agujas contaminadas desechar en los sitios dispuestos para esto.

1.2. Manejo de Sustancias Químicas.

1. El Colcemid y la colchicina son sustancias tóxicas ya que inhibe el ciclo celular de células proliferativas en la fase de mitosis. Deben manejarse con cuidado (guantes) y evitar el contacto con la piel.
2. El metanol y el ácido acético glacial son altamente tóxicos e irritantes de la piel y mucosas. Evitar el contacto con las superficies expuestas.
3. Desechar el sobrenadante después de ser tratado con clorox durante 20 minutos.
4. El fijador debe ser preparado fresco en el momento de usarlo.

Anexo 2. INDICACIONES DE PREPARACIÓN DE SOLUCIONES MADRE Y DE TRABAJO.

Para calcular cualquier molaridad (M) se puede utilizar la siguiente fórmula:

$$(PM) \times (M) \times (V) = \text{grs} \quad (1)$$

PM= peso molecular de la sustancia en grs/mol

M= molaridad en moles/litro

V= volumen a preparar en litros.

grs= cantidad (en grs) de la sustancia requerida para la molaridad deseada.

Por ejemplo, para la solución KCL 0,075 M, hipotónica utilizada en el procesamiento de los cultivos celulares de sangre periférica, el cálculo de la cantidad de sustancia requerida (en grs) para preparar 0.1 lt (100 ml) de solución, se tiene:

$$PM (KCL) = 74.56 \text{ grs/mol}$$

$$M = 0.075$$

$$V = 0.1 \text{ lt}$$

Reemplazando en la fórmula (1), se tiene:

$$74.56 \times 0.075 \times 0.1 = 0.5592 \text{ grs}$$

En la solución que se prepara en el Laboratorio, se pesa 0.56 gr de KCl para disolver en 100 ml destilada.

ANEXO 3. SOLUCIONES UTILIZADAS EN EL REVELADO DE LOS CARIOTIPOS.

FIJADOR PARA PELICULA O PAPEL

Agua 50° C	600 ml
Tiosulfato o hiposulfito de Sodio	240 gr
Sulfito de Sodio	1.5 gr
Acido acético 28%	48 ml
Acido bórico	7.5 gr
Alumbre de potasio (ALK (SO ₄) ₂ .12 H ₂ O	15 gr
H ₂ O	hasta un Litro

REVELADOR D-19

Agua 50°C	500mlk
Elon	2grs
Sulfato de Na	90.0 grs
Hidroquinona	8.0 grs
carbonato de Na	52.5 grs
bromuro de K	5 grs
se completa un litro 5 minutos de revelado.	

ANEXO 4. ALGUNAS SOLUCIONES REQUERIDAS EN EL PROCESO DE COLORACIÓN DE EXTENDIDOS CROMOSOMICOS.

GIEMSA

1 gr en polvo de giemsa

66 ml de glicerina

66 ml de metanol puro

Agregar los 66 ml de glicerina sobre el polvo colocar en estufa a 60° C por 1 hora y dejar enfriar y agregar 66 ml de metanol para análisis.

PENICILINA

1.000.0 U + 20 ml de agua tridestilada.

solución madre: 540 U/ml

solucion de trabajo: 5000 u/ml (1ml solución madre + 9ml de sln salina estéril)

BUFFER GIEMSA (Buffer Sorensen)

0.582 gr Na_2HPO_4 (PM)=141.98

0.583 gr NaH_2HPO_4 (PM)=139.99

1. Disolver 0.58 grs de Na_2HPO_4 en 500 ml de agua destilada. Solución A

2. Disolver por separado 0.358 grs de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en 500 ml de agua destilada. Solución B.

En un beaker de 1000 ml colocar 400ml aproximadamente de la solución A y agregar poco a poco la solución B hasta que el pH= 7.2 si sobra un poco de

solución A o B se puede adicionar proporcionalmente siempre y cuando el pH final sea 7.2.

HCL 1N pureza 37%

$\rho = 1.186 \text{ grs / v (densidad)}$

PM = 36.5

8.3mls de Hcl en 100ml de agua

NaOH 1N

1N = 40 gr / 1000 mls

BANDAS C

Solución de Hidróxido de Bario (BaOH): 5 grs de BaOH en 95 ml de agua destilada. Mezclar por varios minutos. Dejar sedimentar. Filtrar el sobrenadante antes de usarlo. Si se reutiliza se debe filtrar.

HOECHST 33258

3 mg /60 ml de agua destilada

RPMI 1640

10.4 grs en 1 litro de agua bidestilada. Adicionar 2 grs de carbonato de sodio (NaH CO_3). Cuadrar el pH= 7.08 con HCl 1N .

BrdUrd

Disolver 20 mg en 10 mls de agua bidestilada se filtra con miliporo 0.22µm estéril.

2× SSC

0.3 M NaCl (8.768 grs / 500ml).

0.4 M citrato de sodio. Mezclar las anteriores proporciones 1:1. Ajustar pH 7.87 con HCl 1N.

COLCHICINA

0.4 mg/10 ml (0.04%)